

**Modifizierung der chromosomenschädigenden
Aktivität von Trenimon^R durch
Acetylsalicylsäure, Äthylendiamintetraessigsäure
und Coffein in menschlichen Lymphocytenkulturen**

von
Wiltrud Kaufmann
aus
Hamm / Westfalen



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548222_0075

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. med. G. Koch

**Modifizierung der chromosomenschädigenden
Aktivität von Trenimon^R durch
Acetylsalicylsäure, Äthylendiamintetraessigsäure
und Coffein in menschlichen Lymphocytenkulturen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt
von
Wiltrud Kaufmann
aus
Hamm / Westfalen

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Priv.-Doz. Dr. E. Gebhart

Korreferent: Prof. Dr. G. Koch

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.1977

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methode	2
2.1. Kulturansatz	3
2.2. Modellclastogen, Modifikatoren und ihre Applikation	3
2.3. Cytogenetische Auswertung	3
2.4. Modifikationsfaktor und Schwellenwert	5
2.5. Statistische Auswertung	6
3. Ergebnisse	8
3.1. Die cytogenetische Eigenaktivität der Testsubstanzen	8
3.1.1. Modell-Clastogen Trenimon ^R	8
3.1.2. Acetylsalicylsäure	8
3.1.3. EDTA	9
3.1.4. Coffein	10
3.2. Modifizierende Aktivität	10
3.2.1. Acetylsalicylsäure	10
3.2.1.1. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon im Schwellenwertsbereich	11
3.2.1.2. Modifizierende Wirkung bei Verwendung von Trenimon oberhalb des Schwellenwertsbereiches	11
3.2.2. Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)	11
3.2.3. Coffein	14
3.2.3.1. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon im Schwellenwertsbereich	14
3.2.3.2. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon oberhalb des Schwellenwertsbereiches	16
3.2.4. Statistischer Anhang	19
3.3. Interzelluläre Bruchverteilung	20

4.	Diskussion	22
4.1.	Die biochemische Aktivität des Clastogens	22
4.2.	Aktivität und Wirkungsmechanismen der Modifikatoren	22
4.3.	Schlußfolgerungen	28
5.	Zusammenfassung	29
6.	Literatur	30
7.	Tabellen und Abbildungen	36

1. Einleitung

Die heute weitgehend übliche therapeutische Verwendung von Pharmaka-Kombinationen birgt nicht nur unter dem Aspekt pharmakologischer und pharmakokinetischer Wechselwirkungen Gefahren in sich. Es ist allgemein bekannt, daß verschiedene Arzneimittel auch schädigende Nebenwirkungen auf das menschliche Erbgut entfalten können, also mutagen sind (BARTHELMÉ 1956, GOLDSTEIN 1962, RÖHRBORN 1965, LOVELESS 1966, OSTERTAG 1966). Die Frage, inwieweit die mutagenen Nebenwirkungen von Arzneimittelbestandteilen durch andere Wirkstoffe beeinflusst werden können, ist noch nicht geklärt. Während aus Modelluntersuchungen bereits z.T. umfangreiche Befunde hinsichtlich der antimutagenen Wirksamkeit bestimmter Substanzen vorliegen (GEBHART 1974), liegen hinsichtlich einer comutagenen, und damit für den Menschen besonders bedenklichen Wirkung erst wenige Ergebnisse mit einzelnen Substanzen vor.

In Modelluntersuchungen mit *Vicia faba* (SWIETLIŃSKA 1971, 1973, MICHAELIS, RIEGER 1962) wurde die comutagene Aktivität von Coffein und Äthylendiamintetraessigsäure entdeckt. Umfangreiche Untersuchungen über die comutagene Wirkung des Coffeins wurden mittlerweile durch die Arbeitsgruppe um KIHLMAN an *Vicia faba* sowie Zellkulturen des Chinesischen Hamsters durchgeführt (KIHLMAN et al. 1973, 1974; KIHLMAN 1974). LEHMANN et al. (1974) wiesen die comutagene Aktivität des Coffeins an menschlichem Zellmaterial nach.

An menschlichen Lymphocytenkulturen sollte geklärt werden, inwieweit die als Bestandteil von Analgetika in großen Mengen konsumierte Acetylsalicylsäure und das Coffein sowie der Chelatbildner Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA) in der Lage sind, die chromosomenschädigende Wirksamkeit eines starken Mutagens zu beeinflussen. Als Modell-Aberrationsinduktor (Clastogen) wurde das trifunktionelle Äthyleniminderivat Trenimon (Triäthyleniminbenzo-

chinon- 1,4) gewählt, da seine cytogenetische Aktivität bereits sehr gut bekannt war (HAMPEL 1968, GEBHART 1970 a). Durch diese Untersuchungen sollte ein Beitrag zur weiteren Klärung der Wechselwirkungen verschiedener Substanzen mit einem bekannten Clastogen geleistet werden.

2. Material und Methode

2.1. Kulturansatz

Für den Ansatz von Lymphocytenkulturen wurde die abgewandelte Mikromethode nach MOORHEAD et al. (1960) verwendet. Jede Kultur enthielt 0,6 ml heparinisiertes venöses Blut von gesunden Spendern, 0,2 ml Serum vom foetalen Kalb (COLORADO SERUM COMPANY) und 6 ml penicillinhaltiges (500 I.E. / ml) Medium TC 199 (DIFCO). Zur Mitosestimulierung wurden jedem Kulturansatz 0,2 ml Phythaemagglutinin (WELLCOME) zugesetzt. Die Kulturdauer betrug im allgemeinen bei 37°C 72 Stunden. Die Chromosomenpräparation erfolgte gemäß den Standardvorschriften für Lymphocytenkulturen: einer zweistündigen Behandlung mit Colcemid in der Endkonzentration (0,4 µg/ml) zur Blockierung der Mitosen in der Metaphase folgte eine hypotone Behandlung mit 0,5 %igem Natriumcitrat und eine Fixierung mit einer Mischung von Methanol: Eisessig im Verhältnis 3:1. Die luftgetrockneten Präparate wurden für 2 - 4 Stunden in einer Lösung von essigsäurem Orcein gefärbt. Die Herstellung von Dauerpräparaten erfolgte unter der Verwendung von Eukitt.

Die einzelnen Testserien wurden in Untergruppen geteilt, wobei eine jede Untergruppe aus 2 Kulturen bestand. In jeder Serie blieb jeweils eine Untergruppe unbehandelt, während spezifische Trenimon- und Modifikatorkonzentrationen den anderen zugesetzt wurden. Die verschiedenen Konzentrationsstufen sind den einzelnen Versuchen zu entnehmen.

2.2. Modellclastogen, Modifikatoren und ihre Applikation

Die chemische Struktur der verwendeten Substanzen ist der Abb. 1 zu entnehmen.

Trenimon wurde gemäß den Anweisungen der Firma BAYER in 20 ml einer 0,9 %igen Natriumchloridlösung gelöst. Die Acetylsalicylsäure wurde in 37 °C warmem Medium TC 199 (DIFCO) gelöst und für 24 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Das Coffein löste sich in warmem aqua tridestillata. Das EDTA lag in einer 0,1-molaren gebrauchsfertigen Lösung vor. Von allen verwendeten Testsubstanzen wurde eine Stammlösung und anschließend eine Verdünnungsreihe hergestellt. Wie bei den einzelnen Versuchsreihen angegeben, wurden die Pharmaka in den ausgetesteten Endkonzentrationen zu unterschiedlichen Zeiten den Kulturen zugegeben.

Die Stammlösungen waren in solchen Konzentrationen angesetzt, daß pro Kulturansatz höchstens eine Menge von 0,4 ml eingebracht werden mußte. Alle parallel angesetzten Kulturen wurden mit derselben Substanzmenge versetzt. Zum Ausschluß von Verdünnungseffekten enthielten die mitlaufenden Kontrollversuche die entsprechende Menge von Lösungsmittel.

Die Behandlungszeit mit dem Modellclastogen Trenimon betrug grundsätzlich 24 Stunden, während die Einwirkzeiten der verschiedenen Testsubstanzen 48, 24, 6 oder 2 Stunden betrugen (BEEK et al. 1974, DUDIN et al. 1974).

2.3. Cytogenetische Auswertung

Für jede Versuchsstufe wurden je 50 - 100 gut analysierbare Metaphasenplatten aus 2 bis 6 Versuchsansätzen bei 1250facher Vergrößerung lichtmikroskopisch ausgewertet.

Bei der cytogenetischen Analyse wurden in erster Linie chromosomale Strukturdefekte gemäß den Kriterien (RIEGER, MICHAELIS 1967) erfaßt (Abb. 2):

Chromosomenaberrationen

In diese Kategorie gehören die terminalen und die interstitiellen Deletionen. Es sind beide Chromatiden betroffen. Interstitielle Deletionen kommen in dieser Untersuchungsreihe kaum vor.

Chromatidenaberrationen

Diese Aberrationen ähneln denen auf chromosomaler Basis in vielfacher Hinsicht.

1) Achromatische Läsionen (Gaps) oder lokale Achromasien

Sehr häufig ist nur eine Chromatide betroffen, seltener beide. Hierbei handelt es sich möglicherweise um ungefärbte Regionen in der Chromatidstruktur. EVANS (1961) interpretierte die in der Mitose nachweisbaren "gaps" als jenen Anteil separabler, mutageninduzierter Läsionen, der im Ablauf der interphasischen DNA-Synthese nicht "repariert" worden ist.

2) Chromatidenbrüche

Die Chromatidenbrüche sind das Ergebnis der Brüche nur einer Chromatide, wobei ein azentrisches Fragment entsteht, das meistens disloziert liegt.

3) Translokationen

Die Translokationen sind das Ergebnis eines wechselseitigen Austausches von Chromosomensegmenten unterschiedlicher Chromosomen. Zu dieser Gruppe gehören: Triradiale, Translokationskreuze (symmetrische und asymmetrische) und die Translokationskomplexe. Sie sind in den einzelnen Versuchen unter E (Exchanges) zusammengefaßt.

2.4. Modifikationsfaktor, Definition des Schwellenwertbereiches

Unter dem Schwellenwertsbereich einer Substanz ist der Konzentrations-Bereich zu verstehen, in dem die Substanz gerade keine eigene cytogenetische Aktivität mehr erkennen läßt (KAUFMANN 1972; KAUFMANN et al. 1973).

Die Größe des Modifikatoreffektes wurde als der Modifikationsfaktor "Mf" dargestellt.

Unter diesem Begriff wird der Quotient aus der Anzahl der Aberrationen unter der Behandlung mit dem Modellclastogen Trenimon und dem entsprechenden Modifikator und der Anzahl der Aberrationen unter alleinigem Einfluß des Clastogens verstanden.

Nach Kriterien (GEBHART mdl. Mitt. 1974) wurden Werte, die deutlich unter 0,75 lagen, als Zeichen für einen Schutzeffekt angesehen, Werte die über 1,25 lagen, als Indikator für einen Sensibilisierungseffekt des Agens gedeutet. Der Wert 1 in dieser Arbeit bedeutet, daß weder ein Protektor- noch ein Sensibilisatoreffekt vorliegt.

Eine weitere Möglichkeit zum Nachweis eines Protektor- oder eines Sensibilisatoreffektes ergab sich aus dem Vergleich der interzellulären Bruch-Verteilung nach Einwirkung von Clastogen - sowie kombinierter Einwirkung von Clastogen und Modifikator auf die Zellen.

2.5. Statistische Auswertung (aus KAUFMANN et al. 1973)

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsserien unterliegen gewissen Schwankungen. Um diese mit in die Aussagen einzubeziehen, wurden die geringen Unterschiede zwischen der Häufigkeit der Aberrationsrate bei alleiniger Applikation des Clastogens und bei kombinierter Einwirkung von Clastogen und Modifikator verschiedenen statistischen Testen unterzogen: dem globalen FRIEDMAN-Test, dem paarweisen Vergleich abhängiger Stichproben nach WILCOX und WILCOXON und dem weniger konservativen Standardtest nach MORDACH.

Die relativen Häufigkeiten der relevanten qualitativen Variablen wurden bestimmt.

Aus jeder Kultur wurden 50 - 100 Metaphasen analysiert und die Anzahl der aberranten Zellen der einzelnen Konzentrationsstufen dargestellt.

Im Sinne der Statistik kann jeder Spender als ein Block aufgefaßt werden, da die Parallelkulturen eines jeden Spenders gleich behandelt wurden. Individuelle Faktoren können allgemein innerhalb der Konzentrationsserien als konstant angesehen werden.

Die Fragestellung dieser Untersuchung ist:

- a) Gibt es Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der aberranten Metaphasen zwischen den mit dem Clastogen im Schwellenwertsbereich behandelten Kulturen und denjenigen, die zugleich mit dem Clastogen und dem Modifikator behandelt wurden?
- b) Ist die Konzentration des Clastogens und des Modifikators entscheidend für die Beeinflussung der durch das Clastogen hervorgerufenen Aberrationsrate?

Ein statistisches Testmodell soll dazu verhelfen, die verschiedenen, verbundenen Stichproben zu vergleichen, ohne daß die Art der Verteilung der gefundenen Häufigkeiten bekannt ist. Aus diesem Grund wird als nichtparametrisches Verfahren der FRIEDMAN-Test verwendet.

Die theoretischen Grundlagen können der entsprechenden Literatur entnommen werden (Documenta GEIGY 1968, PFANZAGL 1968, 1972; SACHS 1960; CAVALLI-SFORZA 1972). Bei kleinem k ist eine Approximation durch die n^2 - Verteilung nicht gut. Aus diesem Grund werden Sicherheitsgrenzen c verwendet. Bei Werten, die größer oder gleich c sind, liegt eine Signifikanz vor. Dieser Globaltest wird durch den paarweisen Vergleich multipler paarweiser Verbände abhängiger Stichproben vervollständigt. Die paarweisen Vergleiche, bestimmte Rangziffern vorausgesetzt, zeigen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % oder 5 %, ob die erste Fragestellung bejaht oder verneint werden kann.

Zum speziellen Problem dieser Untersuchung, der Fragen eins und zwei wird der weniger konservative Test mit repräsentativer Gewichtung nach HORBACH verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Die cytogenetische Eigenaktivität der Testsubstanzen

3.1.1. Modell-Clastogen Trenimon^R

Trenimon^R (2,3,5, - Tris - äthylenimino- benzochinon - 1,4) ist auch unter der chemischen Kurzbezeichnung Triaziquon bekannt.

In vitro - Untersuchungen (HAMPEL 1968; GEDHART 1970 a) haben gezeigt, daß dieses Cytostaticum an menschlichen Lymphocytenkulturen erhebliche Veränderungen der chromosomalen Struktur, wie achromatische Läsionen (Caps), Fragmentationen und Austauschfolgen, sei es auf chromatidaler oder chromosomaler Basis, hervorruft. Die in den hier untersuchten Konzentrationsbereichen erhaltenen Ergebnisse sind in Tab. (1) zusammengefaßt.

3.1.2. Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure (ASA) besitzt fiebersenkende, schmerzstillende und antirheumatische Wirkung. Sie ist Bestandteil vieler Kombinationspräparate und eines der am häufigsten verwendeten Medikamente. ASA wurde ebenfalls erfolgreich in der Thromboseprophylaxe eingesetzt. Das Medikament zeigt eine weltweite Verbreitung. Was besonders in genetischer Hinsicht wichtig ist: Es wird als relativ "harmloses" Mittel auch von Menschen eingenommen, die sich im fortpflanzungsfähigen Alter befinden. In den hier durchgeführten Versuchen zeigte sich eine deutliche aberrationsauslösende Wirkung der ASA bei 24-stündiger Einwirkzeit in den Konzentrationen $2,3 \times 10^{-4}$ Mol/l und $1,45 \times 10^{-4}$ Mol/l.

Dabei fanden sich zahlreiche chromosomale Defekte wie Chromatid - und Isochromatid - Caps, Chromatid - und Isochromatid - Brüche und azentrische Fragmente (Tab. 2).

Die Analyse der einzelnen Defekttypen läßt erkennen, daß unter dem Einfluß der ASA in den obengenannten Testserien vor allen

Dingen die Zahl der Achromasien stark ansteigt. Im Gegensatz zur Nullkontrolle traten auch azentrische Fragmente auf. Austauschfolgen waren hier ebensowenig zu finden wie in den mitlaufenden Kontrollen. In den Konzentrationsbereichen $8,4 \times 10^{-5}$ Mol/l; $4,2 \times 10^{-5}$ Mol/l und $2,1 \times 10^{-5}$ Mol/l ließ sich kein Effekt der ASA auf die menschlichen Lymphocytenkulturen nachweisen. Der statistische Vergleich der durchschnittlichen Aberrationsraten aus den ASA-behandelten Kulturen und den Nullkontrollen zeigt insgesamt keine signifikante Abweichung auf dem 1 % - Niveau. $1,65 \times 10^{-4}$ Mol/l scheint die Grenzkonzentration der cytogenetischen Aktivität der ASA zu sein. Der Bereich unter 10^{-4} Mol/l ist also geeignet für die Austestung der Modifikatorwirkung im Schwellenwertsbereich des Trenimons.

3.1.3. EDTA

Der Chelatbildner Äthylendiaminetetraessigsäure (EDTA) ist eine Polyaminocarbonsäure, die mit fast allen Metallen Chelatkomplexe bildet (KAUFMANN et al. 1957). In der Medizin hat er sich als Calciumedetat-Natrium bei der Behandlung der Bleivergiftung gut bewährt, desgleichen bei Vergiftungen durch Vanadium und die radioaktiven Elemente Radium, Zirkonium und Yttrium. Toxische Reaktionen treten bei Tagesdosen von 2 g und mehr auf.

Die Tabelle (3) gibt die Ergebnisse unter der Einwirkung des Testsensibilisators wieder.

Die in den gewählten Konzentrationsbereichen beobachteten Chromosomenaberrationen entsprachen jenen der unbehandelten Kontrollen. Das Agens induziert bei alleiniger Einwirkung auf die Lymphocytenkulturen ausschließlich Gaps und Brüche. Dagegen fanden sich Austauschfolgen hier ebensowenig wie in den Nullkontrollen. Der statistische Vergleich der durchschnittlichen Aberrationsraten zwischen

den mit EDTA behandelten und den unbehandelten Kulturen ergab keinen signifikanten Unterschied auf dem 1 % - Niveau.

3.1.4. Coffein

Die aberrationsauslösende Wirkung des Purinabkömmlings Coffein zeigte sich in zahlreichen Versuchsserien an menschlichen Lymphocytenkulturen (CORNISH et al. 1957, OSTERTAG 1966, DORMON et al. 1969/70, LEE 1971, WEINSTEIN et al. 1972, BRÜGGER 1974, KIHLMAN 1974). Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle (4) zusammengefaßt.

Die cytogenetische Aktivität war konzentrationsabhängig. Es wurden vorwiegend Chromatidgaps und -Brüche sowie Isochromatidgaps und -Brüche beobachtet. Austauschfolgen wurden nicht gefunden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Aberrationsrate nach Einwirkung der für die Modifizierungsuntersuchungen verwendeten Coffeinkonzentrationen die der mitlaufenden Nullkontrollen nicht übertraf.

Der statistische Vergleich der durchschnittlichen Aberrationsraten aus den Nullkontrollen und aus mit Coffein behandelten Kulturen ergab insgesamt keinen signifikanten Unterschied auf dem 1 % - Niveau.

3.2. Modifizierende Aktivität

3.2.1. Acetylsalicylsäure

Es wurden folgende Testserien durchgeführt:

- I.: Gleichzeitige Einwirkung von Trenimon (TIII, TIV, TV) und ASA in den kaum wirksamen Konzentrationsstufen für 24 Stunden.
Bei negativem Ergebnis der ersten Serie erfolgte eine Austestung des Modifikators außerhalb des Schwellenwertbereichs des Trenimons.

II.: Bis zur Fixierung der Kulturen eine 24stündige ASA-Einwirkung und eine 24stündige Trenimonbehandlung.

3.2.1.1. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon im Schwellenwertsbereich

Die Ergebnisse der ersten Serie sind in Tabelle (5) aufgelistet. Unter gleichzeitiger Einwirkung der ASA wird die Anzahl der durch Trenimon im Schwellenwertsbereich induzierten Aberrationen nicht geändert. Exchanges waren weder hier noch in den Nullkontrollen zu beobachten. Beim statistischen Vergleich der Aberrationsraten zeigten sich im FRIEDMAN-Test auf dem 1 % - Niveau keine signifikanten Unterschiede. Bei Anwendung des Testes von WILCOX und WILCOXON zeigten sich ebenfalls keinerlei Abweichungen auf dem 1 % - Niveau und dem 5 % - Niveau. Gemäß dem weniger standardisierten Test von HORBACH (1968) waren auf dem 1 % und dem 5 % - Niveau keine statistisch gesicherten Abweichungen zu finden.

Die gesamten Ergebnisse sind dem statistischen Anhang zu entnehmen (Tab. 18).

3.2.1.2. Modifizierende Wirkung bei Verwendung von Trenimon oberhalb des Schwellenwertbereichs

Die Resultate der zweiten Testserie lassen im wesentlichen folgendes erkennen: Die Anzahl der Chromatid-Gaps wird stark reduziert. Bemerkenswert ist die deutliche Abnahme der Chromatidbrüche, die Anzahl der Translokationen nimmt deutlich gegenüber den nur mit Trenimon behandelten Zellen ab. Desgleichen sind die Isochromatid-Gaps und -Brüche reduziert (Tab. 6) (Abb. 3).

3.2.2. Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA)

Es wurden folgende Testserien durchgeführt:

Serie I: Gleichzeitige 24stündige Einwirkzeit von EDTA im nicht

chromosomenschädigenden Aktivitätsbereich ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l, $4,2 \times 10^{-6}$ Mol/l) und Trenimon in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (Tab. 7).

Serie II: Gleichzeitige 24stündige Behandlung der Lymphocytenkulturen mit Trenimon ($2,25 \times 10^{-9}$ Mol/l) und EDTA in den drei Testkonzentrationen (Tab. 6).

Serie III: Gleichzeitige Einwirkung von EDTA in der höchsten Testkonzentration ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l),

- dabei: a) EDTA-Zugabe 24 Stunden, Trenimonzugabe 22,5 Stunden vor Fixierung der Kulturen
b) EDTA-Zugabe 22,5 Stunden und Trenimonzugabe 24 Stunden vor Fixierung der Kulturen (Tab. 7).

Serie IV: 48stündige Behandlung mit EDTA in der höchsten Testkonzentration (4×10^{-4} Mol/l) und Trenimonzugabe 24 Stunden vor Abbruch der Kulturen.

- Trenimonkonzentrationen: a) im Schwellenwertsbereich
b) $1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l (Tab. 7)

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der ersten Testserie fiel auf, daß der Nf-Wert der Aberrationsrate im allgemeinen Indifferenzbereich liegt. Eine detaillierte Analyse der einzelnen Defekttypen ergab aber folgendes Bild: Besonders bei der niedrigsten Konzentrationsstufe des EDTA zeigte sich eine leichte Reduktion der achromatischen Läsionen. Es trat keine bis eine leichte Abnahme der Isochromatidgaps auf. In allen Konzentrationsstufen fand sich dagegen durchgehend eine konzentrationsabhängige leichte bis mäßige Minderung der Chromatidbrüche. Dagegen konnte - unabhängig von der applizierten Konzentration - keine Veränderung der Zahl der Isochromatidbrüche festgestellt werden. Translokationen waren in den Test-

serien genauso wenig zu beobachten wie in Kontrollen. Ein statistischer Vergleich der Aberrationsraten in den Kulturen, auf die Trenimon und EDTA gemeinsam eingewirkt hatten, mit jenen der nur mit Trenimon behandelten Kulturen erbrachte Unterschiede, die auf dem 1 % - Niveau nicht signifikant waren. Bemerkenswert erscheint dabei die Beobachtung, daß in Kulturen, auf die Trenimon gemeinsam mit der höchsten EDTA-Konzentration einwirkte, überhaupt kein Unterschied zur Trenimonkontrolle erkennbar war.

Sehr deutlich zeigte sich in der zweiten Testserie der Einfluß des EDTA auf die clastogene Wirkung des Trenimons, wenn das Trenimon eine cytogenetische Aktivität zeigte. Wie die Tab. 6 erkennen läßt, fand sich deutlicher reduzierender Effekt des EDTA in allen Konzentrationsbereichen, der auch alle Defekttypen einheitlich betraf (Abb. 4). Der statistische Vergleich wies eine eindeutige Signifikanz auf dem 1 % - Niveau auf.

Die Resultate der dritten Versuchsserie (Teil a) zeigten einen reduzierenden Einfluß des EDTA auf die aberrationsauslösende Wirkung des Trenimons. Die Häufigkeit der Chromatidgaps, - Brüche und Isochromatidbrüche war wie Abb. 5 zu entnehmen ist, deutlich vermindert, während die Anzahl der Isochromatidgaps unbeeinflußt blieb. Bemerkenswert erschien allerdings die eindeutige Reduktion der Anzahl der Translokationen.

Überraschenderweise ergab sich nach der Umkehr der Reihenfolge der Agenszugabe eine auffällige Effektänderung des EDTA. Bei einer oberflächlichen Betrachtung schienen die Aberrationsraten unverändert geblieben zu sein. Wurden aber die Ergebnisse nach den einzelnen Defekttypen aufgeschlüsselt, so ergab sich folgende Situation:

Die Translokationsrate zeigte eine geringe, die Anzahl der Isochromatidgaps eine mäßige und die der Chromatidgaps eine deutliche

Zunahme. Die Zahl der Isochromatidbrüche nahm geringfügig ab, wogegen die der Chromatidbrüche eine eindeutige Erhöhung zeigten ($Mf = 2,16$) (Abb. 6).

Die Resultate der vierten Versuchsreihe lassen im wesentlichen eine mäßige bis starke Erhöhung der Zahl der einzelnen Defekttypen erkennen mit Ausnahme der Isochromatidgaps, deren Häufigkeit erheblich reduziert war (Abb. 7). Im zweiten Teil dieser Serie zeigte sich der Sensibilisatoreffekt des EDTA nicht so deutlich. Das EDTA hatte keinen Einfluß auf die Anzahl der Isochromatidgaps, während die Zahl der Trenimon-induzierten Chromatidgaps und Isochromatidbrüche leicht, die der Chromatidbrüche aber deutlich erhöht war ($Mf = 2,23$). Ebenso war die Anzahl der Austauschfolgen mit einem Mf -Wert von 1,5 leicht erhöht (Abb. 8).

3.2.3. Coffein

3.2.3.1. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon im Schwellenwertsbereich

Bei einer 24stündigen gleichzeitigen Behandlung der Lymphocytenkulturen mit Trenimon im Schwellenwertsbereich und dem Modifikator Coffein ergab sich folgendes Bild: Die Beeinflussung der cytogenetischen Aktivität des Trenimons änderte sich leicht mit der Konzentration des Coffeins. Bei einer Behandlung der Kulturen mit einer Coffeinkonzentration von 10^{-4} Mol/l wurde die Zahl der Chromatidgaps und der Isochromatidgaps nicht beeinflusst, während die Häufigkeit der Isochromatidbrüche mäßig abnahm und die der Chromatidbrüche leicht zunahm.

Eine Erniedrigung der Coffeinkonzentration um die Hälfte blieb hinsichtlich der Zahl der Chromatidgaps ohne Auswirkung, dagegen stieg die Rate der Isochromatidgaps leicht, die der Chromatidbrüche eindeutig an. Eine weitere Reduktion der Coffeinkonzentration führte nun zu dem folgenden Bild (Tab. 10):

Es fand eine Abnahme der Häufigkeit von Chromatid- und Isochromatidgaps statt, die Zahl der Chromatid- und der Isochromatidbrüche nahm hingegen geringfügig zu. Allen drei Konzentrationsstufen ist gemeinsam, daß keinerlei Austauschfolgen auftraten. Eine vergleichende statistische Untersuchung der durchschnittlichen Aberrationsraten aus den Nullkontrollen der mit Coffein behandelten Kulturen ergab keinerlei signifikante Differenz auf dem 1 % - Niveau (Tab. 21). Aus diesem Grund wurden Versuchsserien durchgeführt, in denen gleichzeitig der Zeitpunkt der Coffeinzugabe variiert wurde.

Serie I: Die Coffeinzugabe erfolgte 2 Stunden vor Kulturabbruch.

Serie II: Die Coffeinzugabe erfolgte 6 Stunden vor Kulturabbruch.

Serie III: Die Coffeinzugabe erfolgte 48 Stunden vor Kulturabbruch.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 11, 12, 14 zusammengefaßt. Bei allgemeiner Betrachtung der Resultate der ersten Testserie zeigte sich, daß bei einer mittleren Dosis die Aberrationsrate nicht durch den Modifikator Coffein beeinflusst wurde. Eine genauere Defektanalyse ergab: Die Anzahl der Chromatidgaps wurde stark, die der Isochromatidgaps nur leicht erhöht, im Gegensatz dazu wurde die Anzahl der Brüche stark reduziert. Die niedrigste Coffeinkonzentration beeinflusste die durch Trenimon hervorgerufene Aberrationsrate in der Weise, daß sich die Anzahl der Chromatidgaps und -Brüche leicht erhöhte. Die Häufigkeit der Isochromatiddefekte stieg unter dem Einfluß des Coffeins so stark an, daß Mf-Werte von 3 und 2,25 auftraten (Abb. 9).

In der zweiten Testserie blieb bei der mittleren Coffeinkonzentration (5×10^{-5} Mol/l) die Anzahl der Achromasien vollkommen unbeeinflusst. Allerdings fand sich hier eine mäßige Reduktion der Zahl der Chromatid- und der Isochromatidbrüche (Abb. 10).

Die nach Einwirkung der niedrigsten Coffeinkonzentration

($1,25 \times 10^{-5}$ Mol/l) ermittelten Ergebnisse weichen von den vorher dargestellten Befunden kaum ab. Wie auch bei dem vorhergehenden Versuch blieben die Achromasien unbeeinflusst. Die von Trenimon induzierte Bruchrate wurde unter dem Einfluß von Coffein hinsichtlich der Isochromatidbrüche mäßig, dagegen stark in bezug auf die Chromatidbrüche reduziert. In der dritten Testserie nahm unter der 48stündigen Behandlung der Kulturen mit Coffein die Zahl der Achromasien ab, während die Bruchrate nur mäßig erhöht wurde. Bemerkenswert ist, daß in allen drei Testserien keine Austauschfolgen auftraten.

Im Anschluß an diese Untersuchungen wurden Versuchsserien durchgeführt, in denen außer verschiedenen Coffeinkonzentrationen auch eine höhere Trenimkonzentration appliziert wurde.

3.2.3.2. Modifizierende Aktivität bei Verwendung von Trenimon oberhalb des Schwellenwertsbereiches

Die Versuche wurden in folgenden Serien durchgeführt:

Serie I: Gleichzeitige 24stündige Einwirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) und Coffein in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (10^{-4} Mol/l, 5×10^{-5} Mol/l, $1,25 \times 10^{-5}$ Mol/l).

Serie II: Gleichzeitige Einwirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) und Coffein in der höchsten Konzentrationsstufe. Die Trenimonzugabe erfolgte 24 Stunden und die Zugabe des Coffeins 6 Stunden vor Fixierung der Kulturen.

Serie III: Gleichzeitige Einwirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) und Coffein in der mittleren und der niedrigsten Konzentrationsstufe. Die Applikation des Trenimons erfolgte 24 Stunden und die des Coffeins 2 Stunden vor Kulturabbruch.

Serie IV: 48stündige Behandlung mit Coffein in der höchsten Konzentrationsstufe und Trenimonzugabe 24 Stunden vor Abbruch der Kulturen.

Die Ergebnisse aller vier Serien zeigten, daß der Einfluß des Coffeins auf die cytogenetische Aktivität des Trenimons von der Konzentration des Coffeins abhängig war. Allgemein trat die Tendenz zutage, je niedriger die Coffeinkonzentration war, desto weniger wurde die Anzahl der Brüche beeinflusst. Auffallend war die gleichbleibende Erhöhung der Austauschfolgen mit einem Mf -Wert von 3. Eine Untersuchung der Wirkung der einzelnen Coffeinkonzentrationen auf die Effektivität des Trenimons ergab folgendes Bild (Tab. 13, 22):

Unter dem Einfluß der höchsten Coffeinkonzentration war kein Effekt auf die Achromasien nachzuweisen. Sehr deutlich ließ sich dagegen eine Erhöhung der Anzahl der Isochromatidbrüche und eine besonders starke der Chromatidbrüche zeigen. Unter Einwirkung der mittleren Coffeinkonzentration wurde die Häufigkeit der trenimoninduzierten Achromasien und Isochromatidbrüche nicht beeinflusst, die Zahl der Chromatidbrüche wurde dagegen leicht erhöht. Auffallend war die Wirkung der niedrigsten Coffeinkonzentration. Unter ihrem Einfluß auf das trenimoninduzierte Aberrationsspektrum kam es zu einer leichten Reduktion der Zahl der Chromatidgaps ($Mf = 0,66$), während hingegen die Raten der Chromatidbrüche sowie die der Isochromatidgaps und -Brüche unbeeinflusst blieben (Abb. 11).

Die Ergebnisse der zweiten Testserie (Tab. 15) lassen im wesentlichen folgendes erkennen:

Durch Coffein wurden die Chromatidgaps nicht beeinflusst, während die Zahl der trenimoninduzierten Isochromatidbrüche leicht, die der Isochromatidgaps und der Chromatidbrüche ($Mf = 0,48$) stark reduziert wurden. Die Häufigkeit der Austauschfolgen nahm um die Hälfte ab (Abb. 12).

Aus der Tabelle 16 lassen sich die Resultate der dritten Versuchsreihe entnehmen.

Wie die quantitative Analyse der einzelnen Defekttypen ergibt, wurde unter dem Einfluß des Coffeins die Anzahl der Isochromatidgaps nicht verändert, die der Isochromatidbrüche und die der Austauschfolgen wurde geringfügig reduziert, während dagegen die Zahl der Chromatidbrüche mäßig zunahm (Abb. 13).

In der vierten Versuchsreihe kam es unter dem Einfluß des potentiellen Sensibilisators lediglich zu einer starken Reduktion der Zahl Trenimon-induzierter Isochromatidgaps ($M_f = 0,45$), während auffallenderweise die Anzahl der Chromatidgaps und -Brüche, die der Isochromatidbrüche und die der Austauschfolgen unverändert blieb (Tab. 14) (Abb. 14).

3.2.4. Statistischer Anhang

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind den Tabellen 18 - 22 zu entnehmen.

Im FRIEDMAN-Test zeigten die Versuche mit Acetylsalicylsäure (ohne cytogenetische Eigenaktivität) und mit Trenimon im Schwellenwertsbereich mit $r = 3$ und $k = 4$ die theoretisch limitierende Grenze 9 mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 1\%$. Der Wert wurde in diesen Serien weit übertroffen. Die äquivalente Größe V hatte den Wert 38,6.

Bei den EDTA-Versuchen im Schwellenwertsbereich mit $r = 3$ und $k = 4$ war der Prüfquotient 42,6. Die Coffeinversuche mit Trenimon im Schwellenwertsbereich mit $r = 3$ und $k = 4$ zeigten einen statistischen Prüfquotienten mit dem Wert 43,8.

Der Globaltest ergab also in allen drei Testserien eine eindeutige Signifikanz auf dem 1% - Niveau.

Wurden aber die Resultate dem Test von WILCOX und WILCOXON und dem HORBACH-Test unterzogen, so ergaben sich weder signifikante Unterschiede auf dem 1% - noch auf dem 5% - Niveau. Es fand also keine Beeinflussung des Schwellenwertes von Trenimon durch die Modifikatoren statt (Tabellen 18, 19, 21). Die Versuche einer 24stündigen gleichzeitigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($2,25 \times 10^{-9}$ Mol/l) ergaben nach dem Test von HORBACH einen Prüfquotienten $H = 4,16$ mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 1\%$. Es bestand folglich ein signifikanter Unterschied zwischen den Aberrationshäufigkeiten (Tab. 20).

Wurden die Aberrationshäufigkeiten, die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von menschlichem Zellmaterial mit Coffein ($1,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) und mit Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) auftraten, dem HORBACH-Test unterzogen, so zeigte der Prüfquotient H einen Wert von 7,28 bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 1\%$.

Auch diese Versuchsreihe zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen den Aberrationshäufigkeiten.

3.3. Interzelluläre Bruchverteilung

Wurden menschliche Lymphocytenkulturen mit dem Clastogen Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) behandelt, so fanden sich eine große Anzahl von Zellen, die einen einzigen Bruch aufwiesen, während Zellen mit mehr als 7 Bruchereignissen nur selten vertreten waren.

Bei einer gleichzeitigen Behandlung mit ASA (48 Stunden) und Trenimon (24 Stunden) fand eine deutliche Reduktion der Zellen mit 1, 2, 3 Bruchereignissen statt. Zellen mit mehr als 3 Bruchereignissen fanden sich nicht (Abb. 15).

Fand eine gleichzeitige 24stündige Behandlung der Kulturen mit Trenimon und EDTA statt, veränderte sich das Verteilungsmuster wie der Abb. 16 zu entnehmen ist, nur geringfügig.

Die Anzahl der Zellen mit einem oder zwei Bruchereignissen verringerte sich, die Anzahl der Zellen mit 3, 6 und 7 Bruchereignissen erhöhte sich geringfügig.

Eine Änderung im Verteilungsmuster der Bruchereignisse trat erst bei einer 48stündigen Behandlung der Zellkulturen mit EDTA auf. Die Anzahl der Zellen mit 1, 2, 3 Bruchereignissen war geringfügig erhöht, die mit 4 und 7 mäßig. Dagegen war die Anzahl der Zellen mit 5, 6 und über 7 Bruchereignissen sehr stark erhöht.

Wirkten auf die Zellkultur für 24 Stunden Trenimon und Coffein gleichzeitig ein, so fand eine allgemeine Erhöhung der Zahl der Bruchereignisse statt, die sich regelmäßig auf alle Zellen verteilte.

Wirkte dagegen Trenimon 24 Stunden und Coffein nur 2 Stunden auf die Lymphocytenkulturen ein, so änderte sich das Verteilungsmuster der Bruchereignisse erheblich.

Zellen mit 5, 7 oder mehr Bruchereignissen waren nicht mehr zu beobachten. Die Anzahl der Zellen mit 3, 4, 6 Bruchereignissen nahm

stark ab, während die mit 1, 2 sich mäßig verringerten (Abb. 17).

Wurde Coffein 6 Stunden vor Kulturabbruch appliziert, so nahm die Anzahl der Zellen mit 1, 2, 3, 4 Bruchereignissen drastisch ab, während die Anzahl der Zellen mit mehr als 5 Bruchereignissen sich nur mäßig verringerte (Abb. 18).

Bei einer Behandlung der Kulturen mit Coffein für 48 Stunden trat eine deutliche Erhöhung der Anzahl der Zellen mit mehr als 5 Bruchereignissen auf. Zellen mit 1, 2, 3, 4 Bruchereignissen waren nur geringfügig erhöht.

4. Diskussion

4.1. Die biochemische Aktivität des Clostogens

Die biochemische Aktivität des trifunktionellen Äthyleniminderivates Trenimon beruht auf seinen alkylierenden Eigenschaften. Als wichtigste Reaktion hinsichtlich der Mutagenese scheint ein Umbauprozess am Nukleoprotein eine Rolle zu spielen. Es ist bekannt, daß Trenimon eine erhebliche Hemmung der Glycolyse hervorruft und somit der ATP-Spiegel absinkt. Die Ursache der Glycolyschemmung ist wahrscheinlich die Hemmung der NAD-Synthese (BAYER 1971). GRUNIQUE (1971) stellte an EHRLICH-Aszites-Tumor-Zellen sowohl eine Hemmung der NAD-Synthese sowie eine Beschleunigung des NAD-Abbaus fest. Desgleichen fand er heraus, daß Trenimon die Matrixenaktivität von Chromatin aus EHRLICH-Aszites-Tumor-Zellen im RNS-Polymerase-System erniedrigt. Die cytogenetische Aktivität des Trenimons in menschlichen Lymphocytenkulturen läßt sich durch Zugabe von Acetylsalicylsäure, EDTA oder Coffein also unterschiedlich stark modifizieren. Dabei erwiesen sich die Aktivitätsmuster der einzelnen Modifikatoren als eindeutig abhängig vom Zeitpunkt und von der Dauer ihrer Applikation, ähnliches fanden auch BENDER et al. (1973, 1973, 1974).

4.2. Aktivität und Wirkungsmechanismen der Modifikatoren

Die als Modifikatoren verwendeten Pharmaka wurden z.T. unter dem Gesichtspunkt ihres Vorkommens in Kombinationspräparaten ausgewählt.

Die Acetylsalicylsäure wird bei rheumatischen Erkrankungen bis zu 6 g täglich appliziert.

JARVIK und KATO (1970), JARVIK (1971) bemerkten bei einer Studie am menschlichen Zellmaterial, daß bereits Konzentrationen von 0,1 µg/ml dieser Substanz eine cytogenetische Aktivität entfalten. Nach einer Einwirkung der ASA von 4 Stunden vor Kulturabbruch

erreichte die Aberrationsrate ein doppelt so hohes Niveau wie in den mitlaufenden Kontrollen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung der Acetylsalicylsäure auf menschliche Lymphocytenkulturen in den Konzentrationen $2,3 \times 10^{-4}$ Mol/l bis $2,1 \times 10^{-5}$ Mol/l geprüft. Dabei zeigte sich nur bei der Behandlung mit $2,3 \times 10^{-4}$ Mol/l ein Anstieg der Zahl der Chromatidgaps bis über das Doppelte der Nullkontrolle, während die Bruchrate sich nicht signifikant veränderte.

LOUGHMAN (1971) fand bei einer Konzentration von 6,5 µg/ml keine Erhöhung der Chromatidbruchrate, aber einen vierfachen Anstieg der Chromatidgaps. MAUER et al. (1970) stellten sowohl bei In vivo- als auch bei In vitro - Versuchen fest, "no significant elevation of simple chromosomeaberrations (breakage) was observed at any concentrations of ASA tested". Unter dem Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung der Kulturen mit ASA blieb der Schwellenwert des Trenimons unverändert.

Ein ganz anderes Ergebnis brachte die gleichzeitige Behandlung mit dem Clastogen und dem Modifikator, wenn Trenimon in einer Konzentration mit starker cytogenetischer Aktivität appliziert wurde. Die Anzahl der verschiedenen Defekttypen wurde durch die ASA erheblich reduziert, allerdings nicht bis auf das Niveau der Nullkontrollen. Die Anzahl Trenimon-induzierter Austauschfolgen wurde durch die ASA stärker beeinflußt als die Anzahl der Brüche.

KARASEVA (1975) fand dagegen bei Einwirkung der ASA in der S- und der G₁ - Phase eine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate. Bei Betrachtung der interzellulären Bruchverteilung (Abb. 15) fiel auf, daß keine Zellen mit mehr als 3 Bruchereignissen vorhanden waren.

Über die biochemischen Wirkungsmechanismen der cytogenetischen Aktivität der Acetylsalicylsäure liegen noch keine Untersuchungs-

ergebnisse vor. In welchem Maße eine Beeinflussung des ATP-Spiegels oder der Repairprozesse (FREIFREE et al. 1969, KATO 1974) zur Klärung der anticlastogenen Wirkung herangezogen werden können, ist noch nicht geklärt.

EDTA rief bei einer 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen in den Konzentrationen 4×10^{-4} Mol/l bis 4×10^{-6} Mol/l keine Erhöhung der spontanen Aberrationsrate hervor. MICHAELIS, RIEGER (1965) fanden nach einer Applikation von EDTA (10^{-4} Mol/l) in Haupt**wurzelmeristem** von *Vicia faba* keine Erhöhung der Aberrationsrate.

In der vorliegenden Untersuchung wurde bei einer gleichzeitigen 24stündigen Einwirkzeit von Trenimon und EDTA auf die Kulturen keine Verschiebung des Schwellenwertes des Trenimons gefunden. EDTA übte keinerlei Einfluß auf das Spektrum der durch das Trenimon induzierten Defekttypen aus.

Lag aber die Konzentration des Clastogens in einem Bereich, der mäßig mutagen wirkte, so reduzierte das EDTA 24 Stunden vor Kulturbedebruch die Anzahl der Chromatidaberrationen und die der Isochromatidgaps, während die Anzahl der Isochromatidbrüche kaum beeinflußt wurde. Auffallend war, daß keine Translokationen auftraten.

Wurde Trenimon in einer Dosis appliziert, die stark mutagen wirkte, so erhöhte das EDTA bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung der Kulturen die durch das Trenimon hervorgerufene Aberrationsrate. Wirkte EDTA 48 Stunden und Trenimon 24 Stunden auf die Lymphocytenkulturen ein, so erfolgte eine starke Erhöhung der Aberrationsrate. Die Häufigkeit der Gaps und der Isochromatidaberrationen wurde mäßig bis leicht erhöht, während die der Brüche und Chromatidaberrationen stark zunahm. Überraschend war die drastische Reduktion der Austauschfolgen.

MICHAELIS und RIEGER (1962) fanden bei einer 20stündigen Behandlung von pflanzlichem Zellmaterial mit EDTA (10^{-3} Mol/l) und einer 30minütigen mit TEM (10^{-3} Mol/l) eine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate über die alleinige TEM-Applikation-induzierte Rate heraus.

Bei Betrachtung des Einflusses auf die interzelluläre Bruchverteilung (Abb. 16) zeigte EDTA ein Wirkungsmuster, das sich als abhängig von ihrer Einwirkdauer auf das menschliche Zellmaterial erwies.

So war bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung der Kulturen mit dem Clastogen und dem Modifikator EDTA eine Abnahme der Anzahl der Zellen mit 1, 2, 4 oder mehr Bruchereignissen zu beobachten und eine geringfügige Erhöhung der Zahl der Zellen mit 3, 5 oder 6 Brüchen.

Wirkte der Modifikator dagegen 48 Stunden auf die Lymphocytenkulturen ein, so stieg unter dem Einfluß des EDTA die Anzahl der Zellen mit mehreren Bruchereignissen stark an. Die Wirkung des EDTA auf die Anzahl der Translokationen, im Sinne einer Sensibilisierung, könnte auf eine Förderung der Reunion offener Bruchstellen hindeuten.

Die chelatbildende Eigenschaft des Agens scheint eine besondere Rolle hinsichtlich seiner intrazellulären biochemischen Aktivität zu spielen.

Zur Zeit werden folgende Mechanismen für die Wirkung des EDTA diskutiert:

- 1) Blockierung von Mg^{2+} , Ca^{2+} - abhängigen Enzymsystemen
- 2) Direkter Einfluß auf die Chromosomen durch Komplexbildung
- 3) Störung des ionischen Gleichgewichts

Coffein zeigte während einer 24stündigen Behandlung von menschlichem Zellmaterial in Konzentrationen 10^{-4} Mol/l bis 10^{-5} Mol/l

keinerlei Aberrationserhöhung im Vergleich zu den mitlaufenden Nullkontrollen. Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangten THAYER et al. (1971) bei Versuchen an HeLa-Zellen. In einem Konzentrationsbereich von 5 $\mu\text{g/ml}$ bis 20 $\mu\text{g/ml}$ stieg die Anzahl der Aberrationen nicht an. BISHUN et al. (1974) testeten Coffein ebenfalls an HeLa-Zellen. Auch sie fanden keine Zunahme der spontanen Aberrationsrate.

Wurden Zellkulturen von menschlichen Lymphocyten gleichzeitig für 24 Stunden mit dem Clastogen Trenimon im Konzentrationsbereich ohne signifikante Eigenwirkung und mit Coffein in einem nichtcyto-genetischen Konzentrationsbereich behandelt, so trat wie bei der Acetylsalicylsäure und dem EDTA keine Veränderung des Schwellen-wertsbereichs des Trenimons auf.

Bei Applikation des Coffeins 6 und 2 Stunden vor Fixierung der Kulturen ohne Änderung der Coffein- und Trenimonkonzentrationen blieb der Schwellenwertsbereich des Clastogens bei der 6stündigen Behandlungszeit unbeeinflußt. Das Wirkungsspektrum der 2stündigen Coffeineinwirkung unterschied sich davon beträchtlich. Sowohl in der mittleren wie auch mit der niedrigsten Coffeinkonzentration fand eine z.T. leichte bis starke Zunahme der einzelnen Defekt-typen statt. Die mittlere Coffeindosis senkte zudem noch die Häu-figkeit der Bruchereignisse.

Beeinflußte Coffein die Zellkulturen 48 Stunden, so erwies sich der Modifikator gegen die clastogenen Eigenschaften des Trenimons als nicht effektiv.

Wirkte dagegen das Coffein auf das menschliche Zellmaterial 24 Stunden und Trenimon in einer Konzentration mit cytogenetischer Eigenaktivität im gleichen Zeitraum ein, so erhöhte der Modifika-tor die durch Trenimon hervorgerufenen Aberrationsraten beträcht-lich. Der Einfluß des Coffeins auf die interzelluläre Bruchver-teilung äußerte sich in einer starken Zunahme der Zellen mit

Brüchen (Abb. 17). SAN und STICH (1975) beobachteten ebenfalls an menschlichen Lymphocytenkulturen, daß Coffein eine besonders starke Wirksamkeit in der S-Phase entwickelte, wenn der Zellzyklus durch alkylierende Agentien verzögert wurde.

Bei Applikation des Coffeins einen Zellzyklus vor der Trenimonzugabe ergab sich ein ganz anderes Wirkungsspektrum. Coffein hatte kaum einen Einfluß auf die cytogenetische Aktivität des Trenimons, d.h. die Häufigkeit der Brüche wurde nur unwesentlich erhöht, was auch in der Abb. 17 der interzellulären Bruchverteilung zu entnehmen ist.

Bei Zugabe des Modifikators 6 und 2 Stunden vor Fixation der Kulturen kam es zu einem Überraschenden Ergebnis. Coffein reduzierte die durch Trenimon hervorgerufenen Aberrationen beträchtlich. Die interzelluläre Bruchverteilungsrate wies ebenfalls eine über alle Zellen erfolgende Abnahme der Bruchereignisse auf. Während bei der 6stündigen Einwirkzeit die Reduktion der Anzahl der Zellen mit 1. bis mehreren Brüchen erheblich war, trat dieser Effekt unter einer 2stündigen Wirkzeit abgeschwächt auf (Abb. 17, 18).

CLARKE (1968) kam bei Untersuchungen an *Schizosaccharomyces Pombe* zu dem Ergebnis, daß Coffein in niedrigen Dosen einen anticlastogenen Effekt, in hohen Dosen dagegen einen comutagenen habe.

Nach ROBERTS et al. (1974) und VAN DEN BERG und ROBERTS (1975) beruht die synergistische Wirkung des Coffeins auf die Zellkulturen des Chinesischen Hamsters auf einer Hemmung des Repairprozesses. KIHLMAN und seine Mitarbeiter (in VIG 1973) sehen die comutagene Aktivität des Coffeins und anderer Purinabkömmlinge in dem Einfluß auf bestimmte Stellen des Chromatins in der Kernmembran. WEINSTEIN et al. (1973) sehen den comutagenen Effekt des Coffeins teilweise durch eine Hemmung der Phosphodiesterase erklärt, die eine Erhöhung des cAMP bis zu einem clastogenen Niveau bedingt.

4.3. Schlußfolgerungen

Die vorliegenden Untersuchungen haben auf cytogenetischem Niveau Wechselwirkungen von Chemikalien gezeigt, die als Bestandteile von Arzneimitteln von hoher praktischer Bedeutung für den Menschen sind. Coffein, das nicht nur als Genußmittel, sondern auch als Bestandteil der heute mit am häufigsten konsumierten Analgetika vom Menschen in mehr oder weniger großen Mengen inkorporiert wird, ließ dabei keinen comutagenen, (coclastogenen) Effekt erkennen. Dieser wurde auch von anderen Untersuchern an anderen Testsystemen beobachtet (KIHLMAN 1974). Dabei lagen die coclastogenen Konzentrationen dieser Versuche bereits nicht mehr sehr hoch über den bei starkem Kaffeegenuß erreichten höchsten Serumkonzentrationen (KIHLMAN 1974). Es erscheint deshalb in allen Fällen, in denen die z.B. therapeutische Einwirkung von Mutagenen nicht zu vermeiden ist, ratsam, auf die Verabreichung coffeinhaltiger Präparate sowie auf übertriebenen Kaffeegenuß zu verzichten.

Die coclastogene Aktivität der EDTA läßt ihre therapeutische Verwendung bedenklich erscheinen, insbesondere dann, wenn Schwermetallvergiftungen damit behandelt werden. Immerhin ist für einige der Schwermetalle eine clastogene Aktivität beim Menschen bekannt (Cadmium, Quecksilber), die dann eventuell unter EDTA-Einwirkung weiter verstärkt werden kann.

Die vorliegenden Untersuchungen haben die Notwendigkeit verdeutlicht, künftig im Rahmen der praktischen Mutagenitätsprüfung den Wechselwirkungen mutagener mit comutagenen Substanzen ganz besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Dabei müssen unter Einbeziehung von In vivo - Testsystemen am Säuger insbesondere die Frage des Synergismus oder der Potenzierung, der Bedeutung von Mischungsverhältnissen und Reihenfolge der Applikation ebenso wie Fragen der Beziehung zwischen comutagenen und cocarcinogenen Wirkungen weiter geklärt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluß von Acetylsalicylsäure, EDTA und Coffein auf die chromosomenschädigende Wirkung des Testclastogens Trenimon in menschlichen Lymphocytenkulturen untersucht.

Die Modifikatoren wurden in Konzentrationen ohne cytogenetische Eigenaktivität den Kulturen zugesetzt.

Die Applikation des Trenimons dagegen erfolgte in Konzentrationen, die sowohl oberhalb als auch unterhalb seines Schwellenwertsbereichs lagen.

In allen Versuchen zeigte sich, daß der Einfluß der Modifikatoren abhängig war vom Zeitpunkt ihrer Applikation, ihrer Einwirkzeit und von der Konzentration des Modellclastogens. Die ASA reduzierte bei gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung auf die Lymphocytenkulturen die Anzahl aller Defekttypen, wenn Trenimon eine signifikante cytogenetische Aktivität aufwies.

Coffein und EDTA zeigten bei gleicher Versuchsanordnung eine aberrationsfördernde Wirkung unterschiedlicher Intensität. Bei Behandlung der Kulturen 48 Stunden vor Kulturabbruch wirkte ASA sensibilisierend gegenüber der clastogenen Aktivität des Trenimons. Eine Wirksamkeit des Coffeins ließ sich bei dieser Einwirkzeit nicht nachweisen.

Die Applikation des Coffeins 2 und 6 Stunden vor Fixierung der Kulturen verursachte eine Reduktion aller durch Trenimon hervorgerufenen Defekttypen.

Trotz ihrer anticlastogenen Aktivität reduzierten ASA bei 24 Stunden und Coffein bei 2 und 6 Stunden die Aberrationsraten in keinem Versuch bis auf das Niveau der Nullkontrollen.

LITERATUR

- BARTHELMEß, A.: Mutagene Arzneimittel.
Arzneimittelforschung 6, (1956) 157 - 168
- BAYER: Trenimon-Prospekt (1971)
- BEEK, B. and G. OBE: The human leukocyte test system.
II Different sensitivities of subpopulations
to chemical mutagen.
Mut. Res. 24 (1974) 395 - 398
- BENDER, M.A., H.G. GRIGGS, J.S. BEDFORD: Mechanisms of chromosomal
aberration production
I Aberration induction by ultra violet light
Mut. Res. 22 (1973) 387 - 402
- BENDER, M.A., J.S. BEDFORD and J.B. MITCHELL: II Aberrations induced
by 5-bromodeoxy-uridine and visible light.
Mut. Res. 20 (1973) 403 - 416
- BENDER, M.A., H.G. GRIGGS and J.S. BEDFORD: III Chemicals and
ionizing radiation
Mut. Res. 23 (1974) 197 - 212
- BERG, H.W., van den and J.J. ROBERTS: Post-replication repair of
DNA in Chinese hamster cells treated with
" cis " Platinum (II) diamine - dichloride.
Enhancement of toxicity and chromosomal damage
by caffeine.
Mut. Res. 33 (1975) 279 - 284
- BISHUN, N.P., D.C. WILLIAMS, R.W. RAVEN: Chromosome damage to
HeLa cells grown continuously in caffeine.
Mut. Res. 26 (1974) 151 - 155
- BRÜGGER, A.: Caffeine - induced enhancement of chromosome
damage in human lymphocytes treated with
methyl - methane - sulphonate, mitomycin C
and X - rays.
Mut. Res. 23 (1974) 353 - 360
- CAVALLI-SFORZA, L.: Biometrie: Grundzüge biologisch - medizinischer
Statistik.
Gustav Fischer Verlag (1972)

- CLARKE, C.H.: Differential effects of caffeine in mutagen-treated *Schizosaccharomyces Pombe*.
Mut. Res. 5 (1963) 33 - 40
- CORNISH, H.H., A.A. CHRISTMAN: A study of the metabolism of theobromine, theophylline and caffeine in man
J. Biol. Chem. 228 (1957) 315 - 323
- DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen.
7. Auflage (1969)
- DORMON, M., A.M. RAUTH: Effects of caffeine in ultraviolet - irradiated mouse L - cells.
Radiation Res. 39 (1969) 207 - 221
- DORMON, M., B. BARTON, A. PORTE and A.M. RAUTH: The interaction of caffeine with ultraviolet light irradiated DNA.
Intern. J. Radiation Biol., 17 (1970) 395 - 399
- DUDIN, G., B. BEEK and G. OBE: The human leukocyte test-system. I DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 2-day-cultures.
Mut. Res. 23 (1974) 279 - 281
- EVANS, H.J.: Chromatidaberrations induced by gamma irradiation. I The structure and frequency of chromatid interchanges in diploid and tetraploid cells of *Vicia faba*.
Genetics 46 (1961) 257 - 275
- GEBHART, E.: Die Wirkung von L-Cystein auf die Aberrationsauslösung in menschlichen Chromosomen durch chemische Mutagene.
I Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei der Verwendung von Trenimon als Aberrationsinduktor.
Humangenetik 10 (1970 a) 115 - 126
- GEBHART, E.: The treatment of human chromosomes in vitro: results: In: F. VOGEL, G. RÖHRBORN (Eds.)
Chemical mutagenesis in mammals and man.
Berlin - Heidelberg - New York
Springer (1970 b)
- GEBHART, E.: Antimutagens. Data and problems.
Humangenetik 24 (1974) 1 - 32

- GEBHART, E.: mdl. Mitteilungen 1977
- GOLDSTEIN, A.: Mutagens currently of potential significance to man and other species mutations.
In 10. W.J. SCHULL (Ed.) Mutations Second Conference on Genetics
The University of Michigan Press,
Ann. Arbor (1962) 167 - 242
- GRUNICKE, H.: Untersuchung zum Wirkungsmechanismus alkyl-
lierender Cytostatica.
Mitt. Dienst. Ges. z. Bekämpfung d. Krebs-
krankheit 5 (1971) 1 - 94
- HAMPEL, K.E.: Über die Wirkung von Cytostatica auf die
Chromosomen des Menschen
Intern. Zschr. Klin. Pharmakol. Therap.
Toxikol. 1 (1968) 322 - 371
- JARVIK, L.F. and T. KATO: Acetylsalicylic acid: No chromosome
damage in human leukocytes.
Science, Vol. 169 (1970)
- JARVIK, L.F.: Acetylsalicylic acid and chromosome damage.
Science, Vol. 171 (1971) 830
- KARASEVA, N.M.: Cytogenetic action of aspirin in a human
lymphocyte culture.
Bull. Exp. Biol. Med. (1975) 78 / 10
(1194 - 1195)
- KATO, H.: Induction of sister chromatid exchanges by
chemical mutagens and its possible relevance
to DNA-repair
Experimental Cell Research 85 (1974) 239 - 247
- KAUFMANN, B.P. and M.R. Mc.DONALD: The nature of the changes
effected in chromosomal materials by the
chelating agent EDTA.
Proc. nat. Acad. Sci., Wash. 43 (1957) 262 - 270
- KAUFMANN, W.: Bestimmung des Schwellenbereiches der cyto-
genetischen Wirkung von Trenimon.
Diplomarbeit der Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Erlangen -
Nürnberg (1972)

- KAUFMANN, W., E. GEBHART, L. HORBACH: Determination of the threshold value of the mutagenic activity of Trenimon on human lymphocytes "in vitro". Humangenetik 20 (1973) 1 - 8
- KIHLMAN, B.A., S. STURELID, B. HARTLEY-ASP, K. NILSSON: Caffeine potentiation of chromosome damage produced in bean root tips and Chinese hamster cells by various chemical and physical agents. Mut. Res. 17 (1973) 271 - 275
- KIHLMAN, B.A.: The enhancement by caffeine of the frequencies of chromosomal aberrations induced in plant and animal cells by chemical and physical agents. Mut. Res. 26 (1974) 105 - 122
- KIHLMAN, B.A.: Effects of caffeine on the genetic material. Mut. Res. 26 (1974) 53 - 71
- LEE, S.: Chromosome aberrations induced in cultured human cells by caffeine. Japan J. Genet. 46 (1971) 337 - 344
- LEHMANN, A.R. and S. KIRK-BELL: Effects of caffeine and theophylline in DNA synthesis in unirradiated and irradiated mammalian cells. Mut. Res. 26 (1974) 73 - 87
- LOVELESS, A.: Genetic and allied effects of alkylating agents. Butterworths, London (1966)
- LOUGHMAN, W.D.: Acetylsalicylic acid and chromosome damage Science, vol. 171 (1971) 829
- MAUER, J., D. WEINSTEIN and H.M. SOLOMON: Acetylsalicylic acid: No chromosome damage in human leukocytes. Science 169 (1970) 198
- MICHAELIS, A. und R. RIEGER: Influences of EDTA on the induction of chromatid aberrations by triethylenemelamine and ethyl alcohol. Biochem., Biophys. Res. Comm. 9 (1962) 280 - 284

- MICHAELIS, A. and R. RIEGER: Chelate formation as a sensitizing factor in the production of chromatid aberrations by radiomimetic agents. In: "Induction of Mutations and the Mutation Process", Publ. House Czechosl. Acad.Sci. (1965), 101 - 106
- MOORHEAD, P.S., P.C. NOWELL, W.J. MELLMAN, D.M. BATTIPS and D.A. HUNGERFORD: Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell-Res. 20 (1960) 613 - 616
- OSTERTAG, W. Chemische Mutagenese an menschlichen Zellen in Kultur.
F. Steiner, Wiesbaden (1966)
- PFANZAGL, J.: Allgemeine Methodenlehre der Statistik I, II
Sammlung Götschen Band 747, 747 a (1968, 1972)
- PREMPREE, T., T. MERZ: Radio sensitivity and repair time:
The repair time of chromosomal breaks produced during the different stages of the cell cycle.
Mut. Res. 7 (1969) 441 - 451
- RIEGER, R., A. MICHAELIS: Chromosomenmutationen.
G. Fischer, Jena (1967)
- ROBERTS, J.J., J.E. STURBROCK and K.N. WARD: The enhancement by caffeine of alkylation - induced cell - death, mutations and chromosomal aberrations in Chinese hamster cells, as a result of inhibition of post - replication DNA - Repair
Mut. Res. 26 (1974) 129 - 143
- RÖHRBORN, G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung.
Klassifizierungsversuche chemischer Mutagene.
Experientia 16 (1966) 523 - 529
- SACHS, L.: Statistische Auswertungsmethoden
Springer, Berlin-Heidelberg, New York (1968)
- SAN, R.H.C., H.F. STICH: DNA-repair synthesis of cultured human cells as a rapid bioassay for chemical carcinogens.
Int. J. Cancer 16 (1975) 284 - 291

- SWIETLINSKA, Z.: High frequency of chromosome aberrations induced by DEB, with caffeine posttreatment in *Vicia faba* var. minor.
Mol. Gen. Genet., 112 (1971) 87 - 90
- SWIETLINSKA, Z., D. ZABOROUSKA, and J. ZUK: Induction of chromosome aberrations by DEB and caffeine in root meristeme and germinating seeds of *Vicia faba*.
Mut. Res. 17 (1973) 199 - 205
- THAYER, P.S., P. HIMMELFARB, R.H. LISS and B.L. CARLSON: Continuous exposure of HeLa cells to caffeine
Mut. Res., 12 (1971) 197
- VIG, B.K.: Synergism between deoxyribose cytidine and adriamycin in causing chromosome aberrations in human leukocytes.
Mut. Res. 21 (1973) 163 - 170
- WEINSTEIN, D., I. MAUER, L. KATZ and S. KAZMER: The effect of caffeine on chromosomes of human lymphocytes. In vivo and in vitro - studies
Mut. Res. 16 (1972) 391 - 399

7. TABELLEN UND ABBILDUNGEN

Tabelle 1: Cytogenetische Befunde nach Behandlung menschlicher Lymphocytenkulturen mit dem Modell-clastogen Trenimon
Behandlungszeit: 24 Stunden

Trenimon-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)					Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
			G'	G''	B'	B''	E		
0	500	6,6	0,4	3,2	0,8	2,2	-	0,04	0,03
$1,66 \times 10^{-7}$	500	62,5	19,2	21,4	52,2	27,8	8,6	0,40	0,97

Tabelle 2: Cytogenetische Befunde nach Einwirkung der Acetylsalicylsäure auf menschliche Lymphocyten

Behandlungszeit: 24 Stunden

ASA Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)					$\frac{\text{Caps}}{\text{Metaph.}}$	$\frac{\text{Brüche}}{\text{Metaph.}}$
			G'	G''	B'	B''	E		
0	50	10	4	0	1	0	0	0,08	0,02
$2,3 \times 10^{-4}$	50	28	9	0	1	2	0	0,18	0,10
$1,7 \times 10^{-4}$	50	16	4	2	2	2	0	0,12	0,08
$8,3 \times 10^{-5}$	50	10	2	1	0	2	0	0,06	0,04
$4,1 \times 10^{-5}$	50	12	2	2	2	0	0	0,08	0,04
$2,1 \times 10^{-5}$	50	8	1	2	0	1	0	0,06	0,02

Tabelle 3: Cytogenetische Befunde nach Einwirkung von EDTA auf menschliche Lymphocytenkulturen
Behandlungszeit: 24 Stunden

EDTA Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)					$\frac{\text{Gaps}}{\text{Metaph.}}$	$\frac{\text{Brüche}}{\text{Metaph.}}$
			G'	G''	B'	B''	E		
0	500	4	1,2	0,4	1,8	0,6	0	0,016	0,024
$4,2 \times 10^{-4}$	1400	4,6	1,5	1,0	1,0	1,1	0	0,025	0,021
$4,2 \times 10^{-5}$	500	4,0	1,0	0,8	1,4	0,8	0	0,018	0,022
$4,2 \times 10^{-6}$	500	5,0	1,2	0,8	2,0	1,0	0	0,02	0,03

Tabelle 4: Cytogenetische Befunde nach Einwirkung von Coffein auf menschliche Lymphocytenkulturen
Behandlungszeit: 24 Stunden

Coffein Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
			G'	G''	B'	B''		
0	600	5,38	1,5	1,16	2,16	0,66	0,026	0,022
$1,0 \times 10^{-4}$	700	4,27	1,28	1,57	0,71	0,71	0,028	0,014
$5,0 \times 10^{-5}$	800	3,80	0,87	0,87	1,00	1,10	0,017	0,021
$1,3 \times 10^{-5}$	600	3,20	2,00	0,33	0,83	0,16	0,023	0,009

Tabelle 5: Der Einfluß von Acetylsalicylsäure in nicht chromosomenschädigenden Konzentrationen auf die cytogenetische Aktivität von Trenimon im Schwellenwertsbereich bei gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung

Trenimon-Konz. (Mol/l)	ASA-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	600	2,95	0,8	0	1,3	0,98	0	0,009
$5,6 \times 10^{-10}$	0	150	4,5	1,3	1,3	1,3	0,6	0	0,026
$2,8 \times 10^{-10}$	0	150	7,9	4	0,6	0,33	0	0	0,046
$1,4 \times 10^{-10}$	0	150	2,5	1,33	0,6	0	0,06	0	0,002
$7,0 \times 10^{-11}$	0	150	2,5	0,6	0,6	1,33	0	0	0,012
0	$8,3 \times 10^{-5}$	150	5,87	2,15	0,8	1,3	1,63	0	0,032
0	$4,1 \times 10^{-5}$	150	4	1,97	0,3	0,63	0,95	0	0,022
0	$2,1 \times 10^{-5}$	150	5,34	3,12	0,3	1,13	0,80	0	0,034
$5,6 \times 10^{-10}$	$8,3 \times 10^{-5}$	150	5,2	3,3	0,6	0	1,33	0	0,003
$5,6 \times 10^{-10}$	$4,1 \times 10^{-5}$	150	4,6	1,33	1,33	1,33	0,6	0	0,026
$5,6 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-5}$	150	6	4,6	1,33	0	0	0	0,06

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 5 Fortsetzung:

Trenimon- Konz. (Mol/l)	ASA- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
$2,8 \times 10^{-10}$	$8,3 \times 10^{-5}$	150	3,2	0,6	0	1,33	1,33	0	0,06
$2,8 \times 10^{-10}$	$4,1 \times 10^{-5}$	150	6,6	4	0	1,33	1,33	0	0,026
$2,8 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-5}$	150	6	2	0	1,33	2,6	0	0,04
$1,4 \times 10^{-10}$	$8,3 \times 10^{-5}$	150	0,6	0	0	0,6	0	0	0,006
$1,4 \times 10^{-10}$	$4,1 \times 10^{-5}$	150	1,2	0,6	0	0	0,6	0	0,006
$1,4 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-5}$	150	3,9	1,33	0	1,33	1,33	0	0,013
$7,0 \times 10^{-11}$	$8,3 \times 10^{-5}$	150	2,6	1,33	0	1,33	0	0	0,013
$7,0 \times 10^{-11}$	$4,1 \times 10^{-5}$	150	3,9	1,33	0	0,6	2	0	0,013
$7,0 \times 10^{-11}$	$2,1 \times 10^{-5}$	150	2,5	1,33	0	0,6	0,6	0	0,013

Tabelle 6: Der Einfluß von Acetylsalicylsäure ($8,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) auf die cytogetenische Wirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) bei Zugabe der Acetylsalicylsäure und des Trenimons 24 Stunden vor Abbruch der Kulturen

Trenimon-Konz. (Mol/l)	ASA-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	100	8	1	7	0	0	0	0,00
$1,66 \times 10^{-7}$	0	200	62	25	15	57	26	8	0,99
0	$8,3 \times 10^{-5}$	125	9,5	4	2	3,5	0	0	0,035
$1,66 \times 10^{-7}$	$8,3 \times 10^{-5}$	125	37,6	18,4	9,6	20,8	14,4	3,2	0,41

Tabelle 7: Der Einfluß von EDTA in nicht chromosomenschädigenden Konzentrationen auf die cyto-
genetische Aktivität verschiedener Trenimonkonzentrationen bei gleichzeitiger
24stündiger Einwirkung

Trenimon- Konz. (Mol/l)	EDTA- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	900	5,56	1,41	0,88	1,88	1,0	0	0,022
$2,25 \times 10^{-9}$	0	400	16	3,5	3,75	4,72	5,5	0	0,072
$5,60 \times 10^{-10}$	0	200	6	1	1	3,5	0,5	0	0,02
$2,80 \times 10^{-10}$	0	300	5,2	2	0,66	1,66	2	0	0,026
0	$4,2 \times 10^{-4}$	850	5,4	0,46	0,98	1,6	0,62	0	0,024
0	$4,2 \times 10^{-5}$	550	4,2	0,76	0,7	1,06	1,1	0	0,014
0	$4,2 \times 10^{-6}$	600	4,65	1,16	0,99	0,77	0,33	0	0,021
$2,25 \times 10^{-9}$	$4,2 \times 10^{-4}$	400	7,5	1	0,5	4	2	0	0,015
$2,25 \times 10^{-9}$	$4,2 \times 10^{-5}$	300	6,6	0,66	1	1,66	3,33	0	0,016
$2,25 \times 10^{-9}$	$4,2 \times 10^{-6}$	300	6,6	1,66	1,66	1	2,33	0	0,033
$5,60 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-4}$	200	5	1	0	3,5	0,5	0	0,01
$2,80 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-4}$	300	5	1,33	0,33	1,33	2,33	0	0,016
$2,80 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-5}$	300	5	2	0	1	2,33	0	0,02
$2,80 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-6}$	300	3,3	0,66	0,66	0,66	1,33	0	0,013

Tabelle 8: Der Einfluß der Reihenfolge der Zugabe von EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) bei gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung
(Versuch A: Trenimon-Zugabe 1,5 Std. nach EDTA-Zugabe)
(Versuch B: umgekehrte Reihenfolge)

Trenimon-Konz. (Mol/l)	EDTA-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Cups Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	500	6,65	2,41	0,83	1,5	1,91	0	0,032 0,034
$1,66 \times 10^{-7}$	0	500	51	16,5	15,75	28,33	34,55	5,25	0,322 0,738
0	$4,2 \times 10^{-4}$	500	4,3	1,16	1,5	0,83	0,23	0	0,026 0,01
A $1,66 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-4}$	200	20	10,5	8,5	8	24	1,5	0,19 0,35
B $1,66 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-4}$	200	58	19,33	17	104,33	20	0,66	0,36 1,416

Tabelle 9: Der Einfluß des Modifikators EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) (Zugabe: 48 Stunden vor Kulturabbruch) auf die clastogene Wirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l; $5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l) (Zugabe: 24 Stunden vor Kulturabbruch)

Trenimon-Konz. (Mol/l)	EDTA-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	800	6,5	0,73	3,6	0,83	1,36	0	0,045
$1,66 \times 10^{-7}$	0	500	62	16,6	16	69,4	26,2	9,6	0,326
$5,60 \times 10^{-10}$	0	300	6,33	0,66	1,66	4	0,66	0	0,023
0	$4,2 \times 10^{-4}$	800	4,4	2,33	0,465	1,465	1,63	0	0,027
$1,66 \times 10^{-7}$	$4,2 \times 10^{-4}$	500	64	26,6	23,4	141,6	32,2	14,4	0,5
$5,60 \times 10^{-10}$	$4,2 \times 10^{-4}$	300	9,33	3,33	0,33	6,66	3,33	0	0,012
									0,033

Tabelle 10: Der Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung mit Coffein auf die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon

Trenimon-Konz. (Mol/l)	Coffein-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	300	3,0	1,0	1,0	0,66	0,33	0	0,02
$5,6 \times 10^{-10}$	0	300	6,3	3,33	1,33	1,0	0,66	0	0,046
0	$1,0 \times 10^{-4}$	300	3,6	2,33	0	1	0,33	0	0,023
0	$5,0 \times 10^{-5}$	300	4,6	1,66	0,66	1,33	0,66	0	0,023
0	$1,3 \times 10^{-5}$	200	1,5	1	0	0	0	0	0,01
$5,6 \times 10^{-10}$	1×10^{-4}	300	7,3	3,33	1,33	2,33	0,33	0	0,046
$5,6 \times 10^{-10}$	5×10^{-5}	200	10	2,5	2	5,5	0	0	0,045
$5,6 \times 10^{-10}$	$1,3 \times 10^{-5}$	300	4,6	1,33	0,33	2	1	0	0,016

Tabelle 11:

Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein (Zugabe: 2 Stunden vor Abbruch der Kultur) auf die chromosomenschädigende Aktivität einer 24stündigen Trenimoneinwirkung ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l)

Trenimon- Konz. (Mol/l)	Coffein- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	G'	G''	B'	B''	E	Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
0	0	300	2,33	1,33	0,33	0,66	0	0	0,016	0,006
$5,6 \times 10^{-10}$	0	300	6	1,33	0,66	2,66	1,33	0	0,02	0,04
0	$5,0 \times 10^{-5}$	300	4	1	1	1,33	0,66	0	0,02	0,02
0	$1,3 \times 10^{-5}$	250	1,6	1,2	0	0,4	0	0	0,01	0,004
$5,6 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-5}$	200	7	5,5	1	1,5	0	0	0,065	0,015
$5,6 \times 10^{-10}$	$1,3 \times 10^{-5}$	200	10,5	2,0	2	3,5	3	0	0,04	0,065

Tabelle 12: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein (Zugabe 6 Stunden vor Kultur-
abbruch) auf die Aberrationsinduktion durch eine 24stündige Trenimoneinwirkung
($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l)

Trenimon- Konz. (Mol/l)	Coffein- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	200	0,5	0,5	0	0	0	0	0
$5,6 \times 10^{-10}$	0	200	6	2	0	3	1	0	0,04
0	$5,0 \times 10^{-5}$	200	3	1,5	0,5	1	0	0	0,01
0	$1,3 \times 10^{-5}$	200	2	1,5	0	0,5	0	0	0,005
$5,6 \times 10^{-10}$	$5,0 \times 10^{-5}$	200	5	2	1	1,5	0,5	0	0,02
$5,6 \times 10^{-10}$	$1,3 \times 10^{-5}$	200	4,5	2	1,5	0,5	0,5	0	0,01

Tabelle 13:

Der Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit Coffein auf die Aberrationsinduktion des Trenimons ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l)

Trenimon- Konz. (Mol/l)	Coffein- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Gps. Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	300	6,3	1,33	1	2,66	0,33	0	0,023
$1,66 \times 10^{-7}$	0	300	48	22,33	13,3	30,66	14,66	2	0,356
0	$1,0 \times 10^{-4}$	300	3,6	1,33	0,66	1	0,66	0	0,016
0	$5,0 \times 10^{-5}$	300	3,32	0,66	0,66	1,33	0,66	0	0,013
0	$1,3 \times 10^{-5}$	300	1,6	0	0,33	1	0,33	0	0,003
$1,66 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-4}$	300	67,0	26,00	25,33	88,66	25	2	0,513
$1,66 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-5}$	300	47,0	14,3	14	32,66	11,66	5	0,28
$1,66 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-5}$	300	43,0	13	17	31,66	13	4,6	0,30
									0,538

Tabelle 14:

Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein (5×10^{-5} Mol/l und $1,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) (Zugabe: 48 Stunden vor Abbruch der Kultur) auf die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l; $1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) (Zugabe: 24 Stunden vor Abbruch der Kultur)

Trenimon-Konz. (Mol/l)	Coffein-Konz. (Mol/l)	Ausgewertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	G'	G''	B'	B''	E	Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
0	0	350	1	0	0,5	0,5	0	-	0,005	0,030
$1,66 \times 10^{-7}$	0	150	86	22	24	159	30	17	0,46	2,23
$5,60 \times 10^{-10}$	0	200	6	3	0	2	1	0	0,03	0,03
0	1×10^{-4}	150	6	0	2	2	2	0	0,02	0,04
0	5×10^{-5}	200	4	2	0	2	0	0	0,02	0,02
0	$1,3 \times 10^{-5}$	200	1	1	0	0	0	0	0,01	0,00
$1,66 \times 10^{-7}$	1×10^{-4}	150	88	27,33	10,66	187,33	36,66	20	0,39	2,63
$5,60 \times 10^{-10}$	5×10^{-5}	200	8,5	2	2	2,5	2	0	0,04	0,045
$5,60 \times 10^{-10}$	$1,3 \times 10^{-5}$	200	5	1,5	0,5	2	1	0	0,02	0,03

Tabelle 15: Die Beeinflussung der cytoogenetischen Wirkung einer 24stündigen Trenimonbehandlung
($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) durch eine gleichzeitige 6stündige Einwirkung von Coffein

Trenimon- Konz. (Mol/l)	Coffein- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	G'	G''	B'	B''	E	Gaps Metaph.	Brüche Metaph.
0	0	150	1	0	0	1	0	0	0	0,01
$1,66 \times 10^{-7}$	0	150	88	22	24	159	30	17	0,46	2,23
0	$1,0 \times 10^{-4}$	150	6	0	2	2	2	0	0,02	0,04
$1,66 \times 10^{-7}$	$1,0 \times 10^{-4}$	150	50	17,33	11,33	82	20	10,66	0,28	1,23

Tabelle 16: Der Einfluß des Modifikators Coffein während der letzten 2 Stunden der Kulturzeit auf die aberrationsauslösende Wirkung von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l)

Trenimon- Konz. (Mol/l)	Coffein- Konz. (Mol/l)	Ausge- wertete Metaph.	Aberr. Metaph. %	Aberrationstypen (%)				Caps. Metaph.	Brüche Metaph.
				G'	G''	B'	B''	E	
0	0	200	9	2	1,5	5	0,5	0	0,035
$1,66 \times 10^{-7}$	0	200	38,5	26,5	9,5	16	13,5	2	0,335
0	$5,0 \times 10^{-5}$	200	3	0,5	0	2	0,5	0	0,005
$1,66 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-5}$	200	36,5	5	11	26	9,5	1,5	0,385

Tabelle 17: Vergleich der einzelnen Modifikatoreffekte auf die cytogetetische Aktivität des Clastogens Trenimon während unterschiedlicher Einwirkzeit und - Dauer

Trenimon: $1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l						
Aberrationstyp:	G	B	E	Chrdt.	Isochrdt.	Wirkzeit
<u>Modifikator: Mol/l</u>						
ASA	4×10^{-4}	+++	+++	+++	++	24
EDTA	$4,3 \times 10^{-4}$	-	xxxx	xx	++	24
EDTA	$4,3 \times 10^{-4}$	(x)	+++	xx	x	48
Coffein 1	$\times 10^{-4}$	xxx	xxxx	xxxx	xxx	24
Coffein 5	$\times 10^{-5}$	(+)	xxxx	---	---	24
Coffein 1	$\times 10^{-5}$	---	xxxx	+	---	24
Coffein 1	$\times 10^{-4}$	(x)	---	---	---	48
Coffein 5	$\times 10^{-5}$	++	++	++	++	6
Coffein 5	$\times 10^{-5}$	++++	x	++	+++	2
Coffein 1	$\times 10^{-5}$	+++	++	++	++	2

Mf - Werte	
1	1,15 = -
1,16	- 1,25 = (x)
1,26	- 1,40 = x
1,41	- 1,80 = xx
1,81	- 2,10 = xxx
2,10	= xxxx
	= -
	= (+)
	= +
	= ++
	= +++
	= ++++

Tabelle 18a:

Der statistische Vergleich der Aberrationsraten, die nach Einfluß von ASA in nicht chromosomenschädigenden Konzentrationen auf die cytogenetische Aktivität von Trenimon bei gleichzeitiger 24stündiger Behandlung von Lymphocytenkulturen beobachtet wurden.

Friedman - Test

Pro- Konzentrationen

band

Trenimon	$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$									
ASA	$2,1 \times 10^{-5}$		$4,1 \times 10^{-5}$		$8,3 \times 10^{-5}$		$8,3 \times 10^{-5}$									
	n_{i1}	a_{i1}	q_{i1}	R_{i1}	n_{i2}	a_{i2}	q_{i2}	R_{i2}	n_{i3}	a_{i3}	q_{i3}	R_{i3}	n_{i4}	a_{i4}	q_{i4}	R_{i4}
Th	15	1	0,06	4	50	1	0,02	3	50	0	0	1,5	50	0	0	1,5
G	50	5	0,10	2,5	50	6	0,12	4	50	5	0,10	2,5	50	4	0,08	1
total	115	8	0,20	3,5	150	10	0,20	3,5	150	8	0,16	1,5	150	8	0,16	1,5

$$V = \frac{12}{rk(k+1)} \sum_{j=1}^K R_j^2 - 3r(k+1)$$

V = 38,6 signifikant auf dem 1 % - Niveau.

i = 1, ..., r Probanden

j = 1, ..., k (Konzentrationen)

a_{ij} = Anzahl der aberranten Zellen bis zur i - ten Person und der j - ten Konzentration

Fortsetzung von Tabelle 18a:

n_{ij} = Anzahl der untersuchten Zellen bis zur i-ten Person und der j-ten Konzentration

q_{ij} = Aberrationsrate bis zur i-ten Person und der j-ten Konzentration

ij^R = Rang der Aberrationsrate bis zur j-ten Dosis im Rahmen der i-ten Person

$V = n^2$ -verteilter Prüfquotient mit $k - 1$ Freiheitsgraden.

$k = 3;4$ Sicherheitsgrenze c (PFANZAGL 1968, 1972)

Tabelle 18b : Paarweiser Vergleich der Rangsummen unterschiedlicher Konzentrationsstufen.

Test von Wilcoxon und Wilcoxon					
Substanzen	Trenimon	ASA	ASA	ASA	ASA
Konzentrationen	$5,6 \times 10^{-10}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$4,1 \times 10^{-5}$	$8,3 \times 10^{-5}$	
$5,6 \times 10^{-10}$	0	2	-3	-3	
$2,1 \times 10^{-5}$		0	-5,5	-5,5	
$4,1 \times 10^{-5}$			0	0	
$8,3 \times 10^{-5}$				0	

Signifikanter Unterschied auf dem 5 % - Niveau: 8,2
 1 % - Niveau: 9,8

Tabelle 18c:

Standardisierter Vergleich der Aberrationshäufigkeiten (HORBACH), die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Einwirkzeit von ASA ($8,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) und dem Modellclastogen Trenimon ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l) auf menschliche Lymphocytenkulturen beobachtet wurden.

Proband	Trenimon		ASA		$N_i^2 \hat{q} (1 - \hat{q}) \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i4}} \right)$		
	n_{i1}	a_{i1}	q_{i1}	n_{i4}	a_{i4}	q_{i4}	
Th	15	1	0,06	50	0	0	32,28
G	50	5	0,10	50	4	0,08	32
U	50	2	0,04	50	4	0,08	20
$\sum_i$	115	8		150	8		54,28

$H = 0,25$ nicht signifikant auf dem 1 % - und dem 5 % - Niveau.

Gewichte : $N_i = n_{ij} + n_{i4}$ $i = 1, \dots, r$ Probanden
 Aberrationsraten : $q_{ij} = \frac{a_{ij}}{n_{ij}}$ $j = 1, \dots, 4$ (Konzentrationen)

Geschätzte Aberrationsrate, Nullhypothese vorausgesetzt

$$\hat{q} = \frac{a_{i1} + a_{i4}}{n_{i1} + n_{i4}}$$

Standardisierter normalverteilter Prüfquotient: $H = \frac{\sum_i N_i (q_{i4} - q_{i1})}{\sqrt{\sum_i N_i \hat{q} (1 - \hat{q}) \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i4}} \right)}}$

Tabelle 19a:

Statistischer Vergleich der Aberrationsraten (HORBACH), die nach Einfluß von EDTA in nicht chromosomenschädigenden Konzentrationen auf die cytogetetische Aktivität von Trenimon bei gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung beobachtet wurden.

Friedman - Test

Pro- band	Konzentrationen																	
	$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$		$2,8 \times 10^{-10}$	
	Trenimon		n_{i1}	a_{i1}	q_{i1}	R_{i1}	n_{i2}	a_{i2}	q_{i2}	R_{i2}	n_{i3}	a_{i3}	q_{i3}	R_{i3}	n_{i4}	a_{i4}	q_{i4}	R_{i4}
	Coffein		100	4	0,04	4	100	0	0	1	100	3	0,03	2,5	100	3	0,03	2,5
Mo			100	4	0,04	3,5	100	4	0,04	3,5	100	3	0,03	2	100	2	0,02	1
V			100	11	0,11	3,5	100	7	0,07	2	100	5	0,05	1	100	11	0,11	3,5
Sp			300	19	0,19	4	300	11	0,11	1,5	300	11	0,11	1,5	300	16	0,16	3
total																		

$V = 42,6$ signifikant auf dem 1 % - Niveau

Tabelle 19b: Paarweiser Vergleich der Rangsummen unterschiedlicher Konzentrationsstufen.

		Test von Wilcoxon und Wilcoxon					
Substanzen		Trenimon	Trenimon	Trenimon	Trenimon	Trenimon	Trenimon
		EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA	EDTA
	Konzentrationen	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-10}$	$2,8 \times 10^{-10}$
		0	$4,2 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-6}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-5}$	$4,2 \times 10^{-4}$
Trenimon	$2,8 \times 10^{-10}$						
EDTA	0	0	-7	-8	-5		
Trenimon	$2,8 \times 10^{-10}$						
EDTA	$4,2 \times 10^{-6}$		0	-1	+3		
Trenimon	$2,8 \times 10^{-10}$						
EDTA	$4,2 \times 10^{-5}$				+3		
Trenimon	$2,8 \times 10^{-10}$						
EDTA	$4,2 \times 10^{-4}$						0

Signifikanter Unterschied auf dem 5 % - Niveau: 8,1
 1 % - Niveau: 9,8

Tabelle 19c: Standardisierter Vergleich der Aberrationshäufigkeiten (HUBBACH) die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($2,8 \times 10^{-10}$ Mol/l) beobachtet wurden.

Pro-band	Trenimon		EDTA		$N_i \hat{L}_q(1 - \hat{q}) (\hat{\lambda}_{i1} + \hat{\lambda}_{i4})$		
	n_{i1}	a_{i1}	q_{i1}	n_{i4}	a_{i4}	q_{i4}	
Mo	100	4	0,04	100	3	0,03	24
Sp	100	11	0,11	100	11	0,11	136
V	100	4	0,04	100	2	0,02	23,6
$\sum$	300	19		300	16		183,6

$H = 0,44$ nicht signifikant auf dem 1 % - und dem 5 % - Niveau.

Tabelle 20:

Standardisierter Vergleich der Aberrationshäufigkeiten (HORRACH), die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($2,25 \times 10^{-9}$ Mol/l) beobachtet wurden.

Proband	Trenimon		EDTA		$N_i^2 \hat{q}(1 - \hat{q}) \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i4}} \right)$	
	n_{i1}	a_{i1}	n_{i4}	a_{i4}		
V	100	17	0,17	100	5 0,05	72
Al	100	20	0,20	100	12 0,12	107,2
F	100	17	0,17	100	4 0,04	72
$\sum_i$	300	54		300	21	251,2

$H = 4,16$ signifikant auf dem 1 % - Niveau.

Tabelle 21 a: Statistischer Vergleich der Aberrationsraten, die nach Einfluß von Coffein in nicht chromosomenschädigenden Konzentrationen auf die cytogetenische Aktivität von Trenimon bei gleichzeitiger 24stündiger Einwirkung beobachtet wurden.

Friedman - Test

Pro- band	Konzentrationen																
		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$		$5,6 \times 10^{-10}$	
	Trenimon																
	Coffein																
		n_{i1}	a_{i1}	q_{i1}	R_{i1}	n_{i2}	a_{i2}	q_{i2}	R_{i2}	n_{i3}	a_{i3}	q_{i3}	R_{i3}	n_{i4}	a_{i4}	q_{i4}	R_{i4}
G8		100	12	0,12	2	100	9	0,09	1	100	13	0,13	3,5	100	13	0,13	3,5
AW		100	2	0,02	1	100	4	0,04	2	100	6	0,06	4	100	5	0,05	3
U8		90	6	0,07	4	100	1	0,01	1	100	2	0,02	2	100	3	0,03	3
total		290	20	0,21	3	300	14	0,14	1	300	21	0,21	3	300	21	0,21	3

$$V = \frac{12}{rk} \left(\frac{k+1}{j=1} \right) K R_j^2 - 3r (K+1)$$

$$V = 42,9$$

Signifikanz auf dem 1 % - Niveau

Tabelle 21b: Paarweiser Vergleich der Rangsummen unterschiedlicher Konzentrationsstufen.

		Test von Wilcoxon und Wilcoxon			
Substanzen	Konzentrationen	Trenimon Coffein	Trenimon Coffein	Trenimon Coffein	Trenimon Coffein
		$5,6 \times 10^{-10}$	$5,6 \times 10^{-10}$	$5,6 \times 10^{-10}$	$5,6 \times 10^{-10}$
Trenimon	$5,6 \times 10^{-10}$				
Coffein	0	0	-4	+5	+5
Trenimon	$5,6 \times 10^{-10}$				
Coffein	$1,3 \times 10^{-5}$		0	+8	+8
Trenimon	$5,6 \times 10^{-10}$				
Coffein	$5,0 \times 10^{-5}$			0	0
Trenimon	$5,6 \times 10^{-10}$				
Coffein	$1,0 \times 10^{-4}$				0

Signifikanter Unterschied auf dem 5 % - Niveau: 8,1
1% - Niveau: 9,8

Tabelle 22: Standardisierter Vergleich der Aberrationshäufigkeiten (HORRACH), die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit Coffein ($1,3 \times 10^{-5}$ mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ mol/l) beobachtet wurden.

Pro-band	Trenimon		Coffein		$N_i^2 \hat{q} (1 - \hat{q}) \left(\frac{1}{n_{i1}} + \frac{1}{n_{i3}} \right)$
	n_{i1}	a_{i1}	n_{i3}	a_{i3}	
HN	100	85	100	59	160
ALZ	100	46	100	56	160
LE	100	117	100	61	72
$\sum_i$	300	248	300	176	392

H = 7,27 signifikant auf dem 1 % - Niveau

Tabelle 21c:

Standardisierter Vergleich der Aberrationsraten (HORBACH), die bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung von Lymphocytenkulturen mit Coffein (5×10^{-5} Mol/l) und Trenimon ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l) beobachtet wurden.

Proband	Trenimon		Coffein		$N_i^2 \hat{q} (1 - \hat{q}) \left(\frac{1}{\hat{q}_{i1}} + \frac{1}{\hat{q}_{i3}} \right)$
	n_{i1}	a_{i1}	n_{i3}	a_{i3}	
GB	100	12	100	13	68
AU	100	2	100	6	24
UB	90	6	100	1	24
$\sum_i$	290	20	300	14	136

$H = 0,10$ nicht signifikant auf dem 1 % - und dem 5 % - Niveau.

Erläuterungen zu den graphischen Darstellungen

In den Abbildungen 3 - 14 wird der Indifferenzbereich des Modifikationsfaktor gestrichelt dargestellt.

Der Mf - Wert wurde bei den Diagrammen 4 - 6, 8 , 10 - 14 mit dem Faktor 10 multipliziert.

In den Säulendiagrammen (Abb. 3 - 14) werden folgende Werte wiedergegeben:

Säule 1 Zahl der Chromatidgaps (Achromasien)

Säule 2 Zahl der Isochromatidgaps

Säule 3 Zahl der Chromatidbrüche

Säule 4 Zahl der Isochromatidbrüche

Säule 5 Zahl der Gaps pro Metaphase

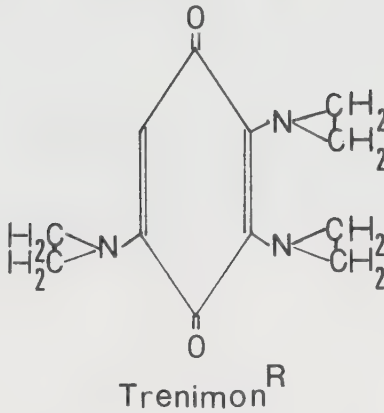
Säule 6 Zahl der Bruchereignisse pro Metaphase

Säule 7 Zahl der Translokationen

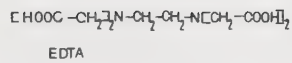
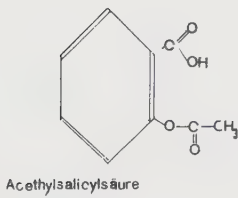
Säule 8 Zahl der Aberrationen pro Metaphase

Abb.1.: Testsubstanzen

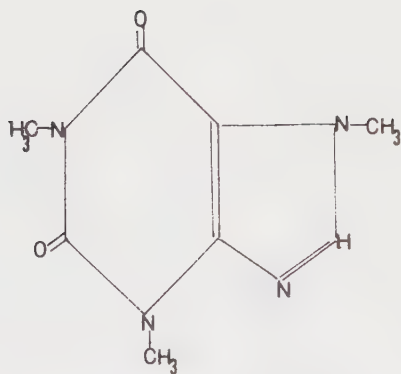
Modell - Clastogen



Modifikatoren



Modifikatoren



1,3,7 Trimethylxanthin

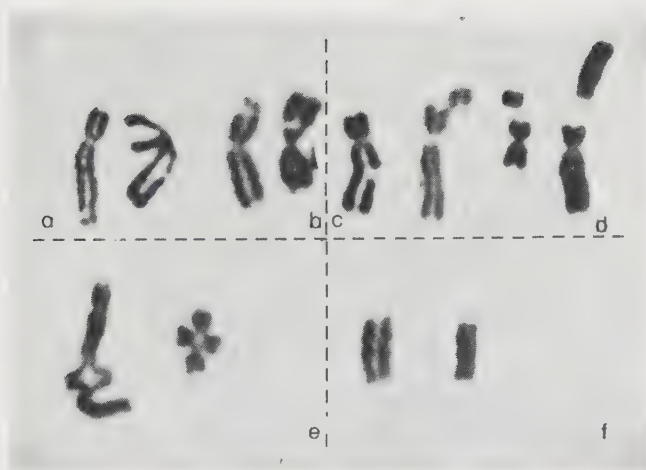


Abb.2: - Aberrationstypen

- a) Chromatid - Gaps
- b) Isochromatid - Gaps
- c) Chromatid - Brüche
- d) Isochromatid - Brüche
- e) Translokationskreuze
- f) azentrische Fragmente

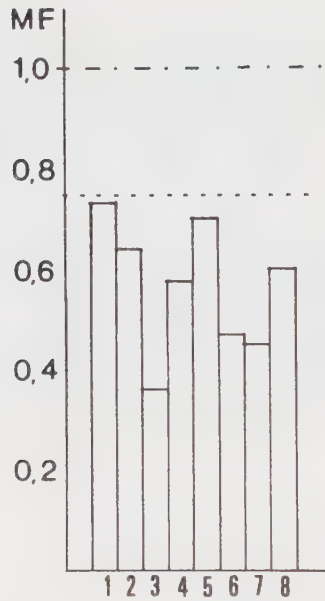


Abb.3: Der Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung mit Acetylsalicylsäure ($8,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) auf die chromosomenschädigende Aktivität von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l).

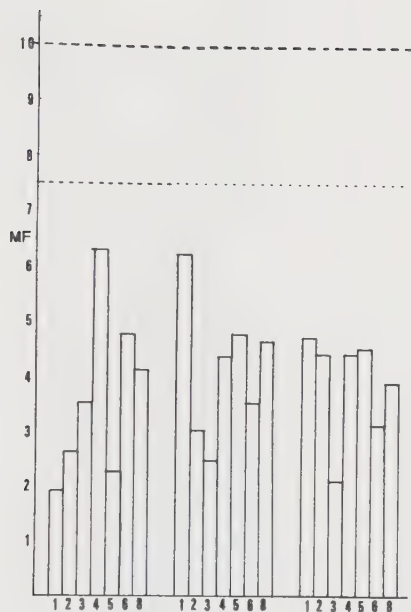


Abb.4: Der Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l; $4,2 \times 10^{-5}$ Mol/l; $4,2 \times 10^{-6}$ Mol/l) auf die chromosomenschädigende Aktivität von Trenimon ($2,25 \times 10^{-9}$ Mol/l).

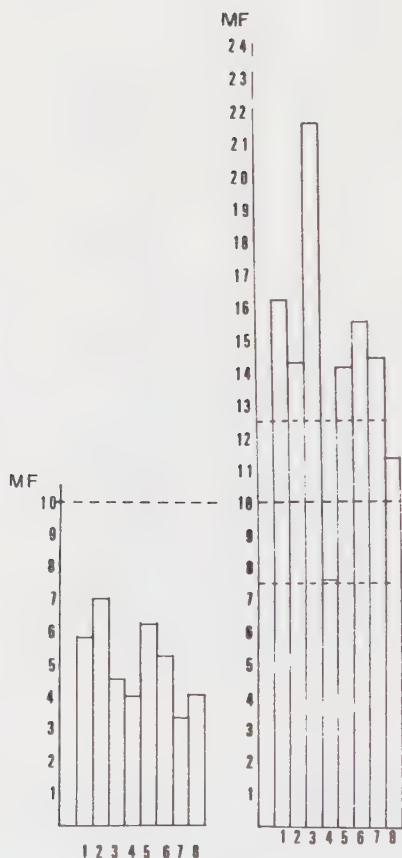


Abb.5: Der Einfluß einer 24stündigen gleichzeitigen Behandlung mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) auf die chromosomenschädigende Aktivität des Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l). Zugabe des Trenimon 22,5 Stunden vor Kulturabbruch.

Abb.6: Der Einfluß einer 22,5stündigen gleichzeitigen Behandlung mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) auf die chromosomenschädigende Aktivität des Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol / l). Zugabe des Trenimon 24 Stunden vor Kulturabbruch.

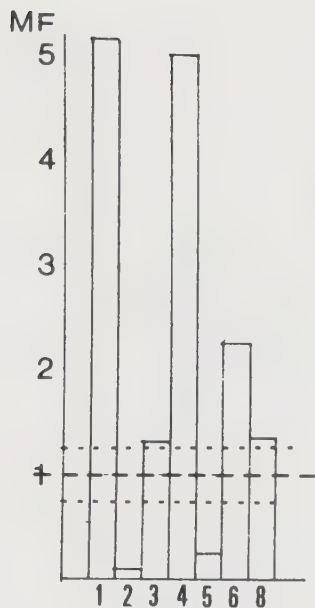


Abb.7: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l; Zugabe: 48 Stunden vor Kulturabbruch) auf die chromosomenschädigende Aktivität einer 24stündigen Trenimoneinwirkung ($2,8 \times 10^{-10}$ Mol/l).

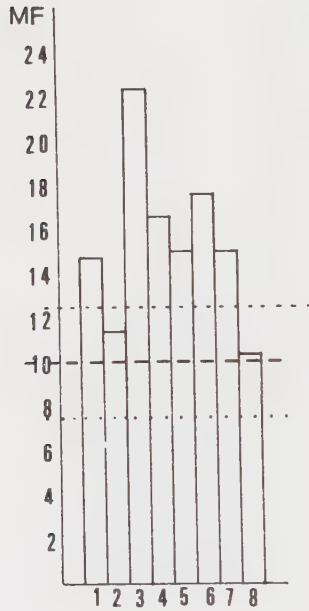


Abb.8: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) auf die chromosomen-schädigende Aktivität von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l). Zugabe des Trenimon 24 Stunden vor Kulturabbruch. Zugabe des EDTA 48 Stunden vor Kulturabbruch.

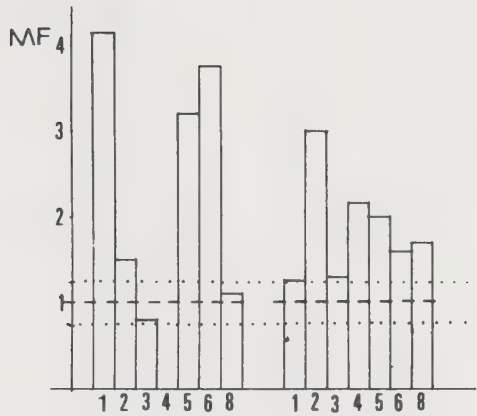


Abb.9: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein ($5,0 \times 10^{-5}$ Mol/l ; $1,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) (Zugabe: 2 Stunden vor Kulturabbruch) auf die chromosomenschädigende Aktivität einer 24stündigen Trenimoneinwirkung ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l).

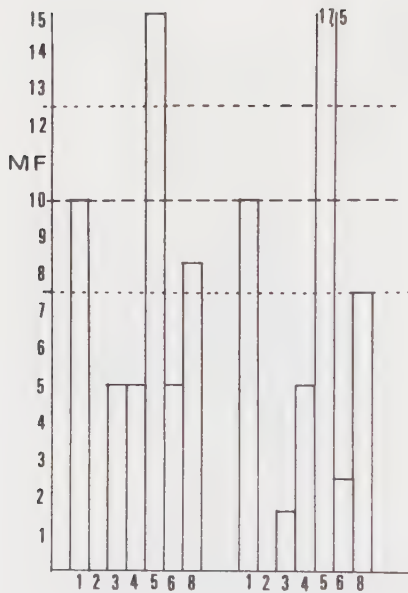


Abb.10: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein (5×10^{-5} Mol/l; 1.3×10^{-5} Mol/l) (Zugabe 6 Stunden vor Kulturabbruch) auf die Aberrationsinduktion des Trenimon ($5,6 \times 10^{-10}$ Mol/l) (Zugabe 24 Stunden vor Kulturabbruch).

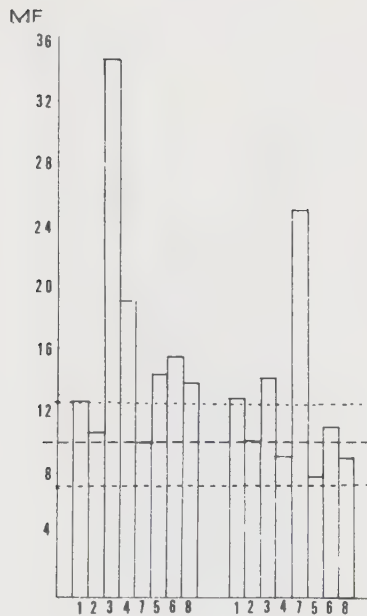


Abb.11: Der Einfluß einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung mit Coffein (1×10^{-4} Mol/l; 5×10^{-5} Mol/l) auf die Aberrationsinduktion von Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l).

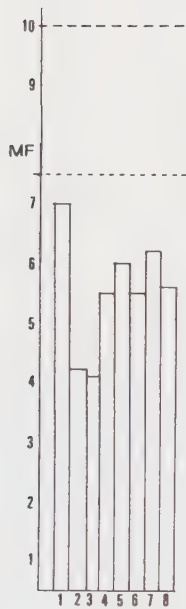


Abb.12: Die Beeinflussung der cytogenetischen Wirkung einer 24stündigen Trenimonbehandlung ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) durch eine gleichzeitige 6stündige Einwirkung von Coffein (1×10^{-4} Mol/l)

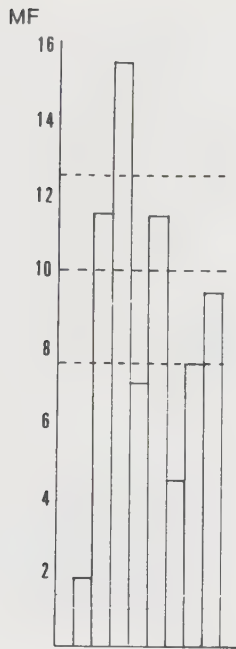


Abb.13: Die Beeinflussung der cytogenetischen Wirkung einer 24stündigen Trenimonbehandlung ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) durch eine gleichzeitige 2stündige Einwirkung von Coffein. (5×10^{-5} Mol/l).



Abb.14: Der Einfluß einer gleichzeitigen Behandlung mit Coffein (1×10^{-4} Mol/l) auf die chromosomen-schädigende Aktivität des Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l) . Coffeinzugabe: 48 Stunden vor Kulturabbruch. Trenimonzugabe: 24 Stunden vor Kulturabbruch.

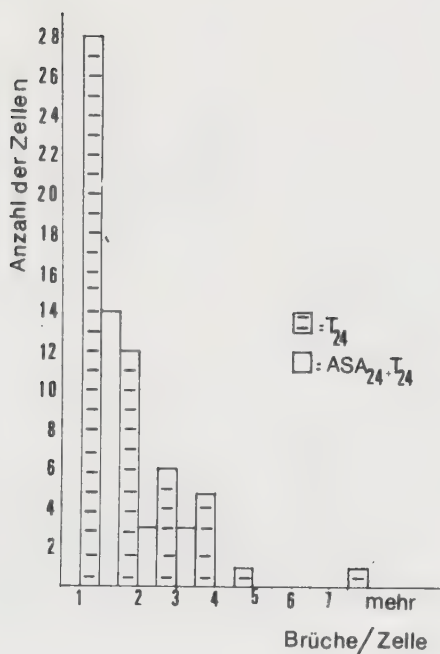


Abb.15: Die intercelluläre Bruchverteilung bei einer gleichzeitigen 24stündigen Behandlung der Zellkulturen mit ASA ($8,3 \times 10^{-5}$ Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l).

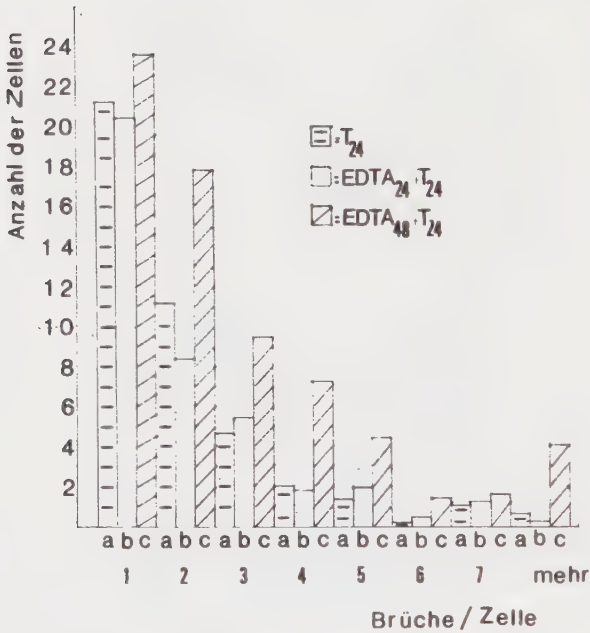


Abb.16: Die intercelluläre Bruchverteilung bei einer gleichzeitigen Behandlung der Zellkulturen mit EDTA ($4,2 \times 10^{-4}$ Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l). Trenimonzugabe: 24 Stunden vor Kulturabbruch. EDTAzugabe: 24 und 48 Stunden vor Kulturabbruch.

Erläuterung: a = alleinige Trenimonbehandlung

b = Trenimonbehandlung₂₄ und EDTA₂₄

c = Trenimonbehandlung₂₄ und EDTA₄₈

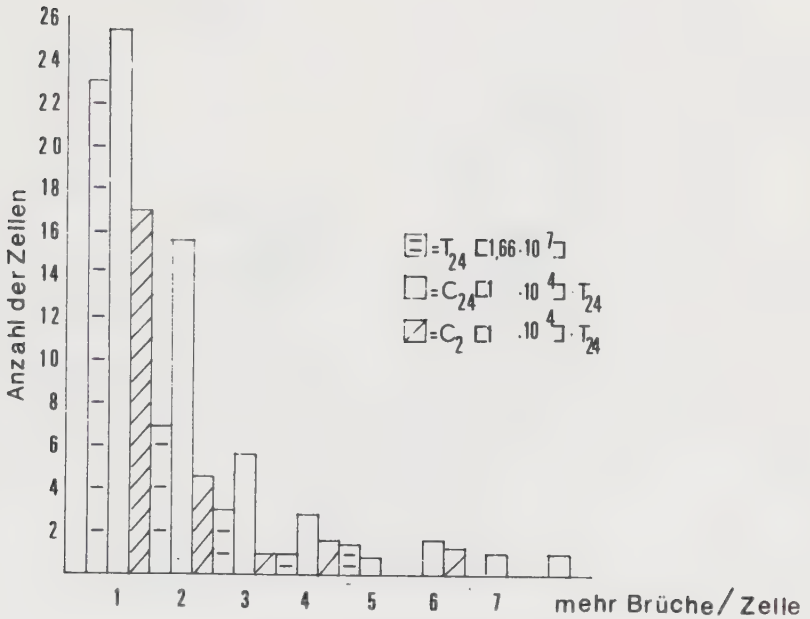


Abb.17: Die intercelluläre Bruchverteilung bei einer gleichzeitigen Behandlung der Zellkulturen mit Coffein (5×10^{-5} Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l). Trenimonzugabe: 24 Stunden vor Kulturabbruch. Coffeinzugabe : 24 und 2 Stunden vor Kulturabbruch.

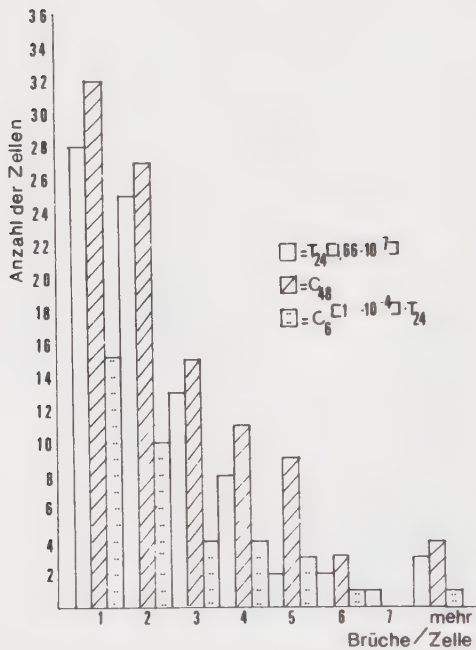


Abb.18: Die intercelluläre Bruchverteilung bei einer gleichzeitigen Behandlung der Zellkulturen mit Coffein (1×10^{-4} Mol/l) und Trenimon ($1,66 \times 10^{-7}$ Mol/l). Trenimonzugabe : 24 Stunden vor Kulturabbruch. Coffeinzugabe : 48 Stunden und 6 Stunden vor Kulturabbruch.

Herrn Professor Dr. G. Koch danke ich für den Arbeitsplatz im Institut für Humangenetik und Anthropologie.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. E. Gebhart für die freundliche Überlassung des Themas und die wertvollen Ratschläge bei Durchführung der Experimente.

Lebenslauf

Am 18. September 1944 wurde ich als erste Tochter des Braumeisters Fritz Kaufmann und seiner Ehefrau Gertrud Kaufmann, geb. Kenkel, in Hamm/Westfalen geboren. Von 1951 an besuchte ich die Volksschule in Vlotho und ab 1956 auch das dortige Neusprachliche Gymnasium.

Am 24.2.1966 bestand ich das Abitur.

Im Sommersemester 1966 begann ich in Münster mit dem Studium für das Lehramt an Realschulen mit der Fächerkombination Chemie und Physik. Im Wintersemester 1967/68 immatrikulierte ich mich an der Universität Erlangen - Nürnberg für die Fächer : Chemie, Physik und Biologie. Im Oktober 1969 legte ich in München das Staatsexamen für Realschullehrer ab.

Im Wintersemester 1969/70 begann ich an der Universität Tübingen das Studium der Biochemie. Im September 1970 legte ich das Vordiplom ab.

Im Wintersemester 1970/71 erfolgte eine Immatrikulation an der Universität Erlangen - Nürnberg für das Fach Biologie. Das Hauptdiplom bestand ich am 15. März 1972. Im Wintersemester 1972/73 erhielt ich die Zulassung zum Studium der Medizin an der Universität Erlangen - Nürnberg. Im Oktober 1973 erfolgte das Physikum, im September 1974 legte ich den ersten Teil des medizinischen Staatsexamens ab und im September 1976 den zweiten Teil. Ab Oktober 1976 begann ich das praktische Jahr an den Universitätskliniken der Stadt Erlangen, das am 30. September 1977 endete. Am 17. Oktober 1977 bestand ich den dritten Teil des Staatsexamens. Die Approbation erhielt ich am 25. Oktober 1977.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990